

UNIVERSITÉ DE PARIS

—

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1952-1953

SÉRIE U

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA
FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
MENTION : PHARMACIE

PAR

A.-L. JOUANNET

Pharmacien-Biologiste

Docteur de l'Université de Paris

RECHERCHES SUR LES CYCLITOLS URINAIRES

présentée et soutenue le 25 Juin 1953

Jury :

MM. P. FLEURY, Président
JANOT, Professeur
J.E. COURTOIS, Professeur

CENTRE DE DOCUMENTATION UNIVERSITAIRE
et S. E. D. E. S. réunis

5, Place de la Sorbonne, 5

PARIS - V*

1955

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. RENÉ FABRE, *Doyen*, C. ✱, ✱ I.
DELABY, *Assesseur*, O. ✱, ✱ I.
G. CUVIER, *Secrétaire Général*, ✱ I.
MM.
L. JEANDEL, *Secrétaire*, ✱ I. A. QUILLIOT, *Rédacteur*.
E. BUVAT, *Commis*, ✱ I. M^{lle} M. DENNY, *Rédactrice*.
M^{me} M.-L. ESPINASSE, *Rédactrice*, ✱ A.

PROFESSEURS

MM. FABRE, C. ✱, ✱ I.	Toxicologie.
DELABY, O. ✱, ✱ I.	Pharmacie chimique.
FLEURY, ✱, ✱ I.	Chimie biologique.
PICON, O. ✱, ✱ I.	Chimie minérale.
MASCRE, O. ✱, ✱ I.	Botanique.
JANOT, ✱, ✱ I.	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, ✱, ✱ I.	Chimie organique.
VALETTE, ✱, ✱ I.	Pharmacodynamie.
BEDDEL, ✱, ✱ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS, ✱, ✱ A.	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
GUILLOT, ✱, ✱ A.	Physique.
GAUTIER, ✱, ✱ I.	Chimie analytique.
LAMBIN (M ^{lle}), ✱, ✱ I.	Microbiologie.
RAOUL, ✱ A.	Zoologie appliquée.
DOMANGE, ✱, ✱ I.	Professeurs à titre personnel.
COURTOIS, ✱, ✱ A.	
CRÈTE, ✱ A.	
CAVIER, ✱ I.	Professeurs sans chaire.
MORETTE, ✱, ✱ A.	
TRUHAUT, ✱, ✱ I.	

Doyen honoraire : M. RADAIS, C. ✱, ✱ I.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DÉLEPINE, C. ✱, ✱ I. et LEBEAU, C. ✱, ✱ I., Membres de
l'Institut.
BOUGAULT, C. ✱, ✱ I., HERISSEY, C. ✱, ✱ I.
LAUNOY, O. ✱, ✱ I.

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

MM. MOREAU, ✱ A.	Sciences physiques et chimiques.
GUY,	Sciences physiques et chimiques.
GERMAN, ✱ A.	Sciences naturelles.
PIETTE, ✱ A.	Sciences naturelles.
QUEVAUVILLER, ✱ A. ..	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. CORRIEZ, ✱ I.	Physique.
HARISPE, ✱ A.	Chimie générale et pharmaceutique.
DEYSSON,	Botanique.
GIRARD, ✱ A.	Chimie biologique.
MANGEOT, ✱ A.	T. P. quatrième année.
RENAULT H., ✱ A.	Chimie analytique.
DESIGNES,	Microbiologie.
BORY,	Sérologie.
N,	Biologie animale.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTAREL, ✱ A.	Pharmacotechnie galénique.
WAROLIN,	Pharmacotechnie chimique.
N,	Pharmacodynamie.

BIBLIOTHÈQUE

<i>Conservateur</i>	M. GARNIER, ✱, ✱ I.
<i>Bibliothécaires</i>	M ^{lle} LAVAUD, ✱ I.
	M ^{me} KREHMER.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552212_0056

A. L. JOUANNET

Pharmacien-Biologiste

Docteur de l'Université de Paris

RECHERCHES

SUR

LES CYCLITOLS URINAIRES



A Monsieur le Professeur P. FLEURY

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Membre de l'Académie de Médecine
Chevalier de la Légion d'Honneur.

qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire
et qui nous a fait le grand honneur de présider
la soutenance de cette thèse.

Hommage de respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur M. M. JANOT

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Chevalier de la Légion d'Honneur

à qui nous lie une ancienne et profonde amitié
et qui nous fait le plaisir et l'honneur de faire
partie de notre jury.

En témoignage de profonde et amicale gratitude.

A Monsieur le Professeur J. E. COURTOIS

Professeur à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur

dont l'appui nous a permis d'entreprendre ce travail
qu'il a dirigé avec une inlassable bienveillance, en
souvenir de nos premières années d'études en commun.

Avec nos sentiments de sincère et amicale
reconnaissance.

A ma Femme

A ma Mère

En témoignage de ma vive affection.

MEIS et AMICIS

RECHERCHES SUR LES CYCLITOLS URINAIRES

Introduction :

Depuis la découverte du mésoinositol dans le muscle, il y a un peu plus de cent ans, de nombreuses recherches ont tenté de préciser son rôle physiologique. Celles-ci ont été rendues difficiles et parfois fort peu concluantes, par suite du fait que, jusqu'à ces dernières années, il n'existait pas de méthode précise permettant de caractériser et de doser, de façon relativement sélective, le mésoinositol.

Depuis quelques années, les Biochimistes disposent de méthodes chimiques et microbiologiques, donnant la possibilité de déterminer le mésoinositol dans les produits biologiques.

1) méthodes chimiques basées sur l'emploi de l'oxydation par l'acide périodique :

On peut doser soit l'acide périodique réduit, soit - ce qui est plus sélectif - déterminer manométriquement la vitesse de dégagement de l'anhydride carbonique libéré dans les phases ultimes de l'oxydation par l'acide périodique.

2) Les méthodes microbiologiques utilisent la croissance de la levure, ou, de préférence, celle du *Neurospora Crassa*; il existe un mutant de ce microorganisme donnant des résultats précis et sélectifs.

Les essais chimiques ou microbiologiques doivent être réalisés sur des extraits suffisamment purifiés et débarrassés des substances associées pouvant interférer dans le dosage.

Au cours d'un travail antérieur réalisé dans ce laboratoire, A. Recoules a mis au point des techniques analytiques permettant d'obtenir, à partir de l'urine, des extraits très riches en mésoinositol ou en cyclohexitols urinaires. Recoules a pu ainsi doser, par l'acide périodique, les cyclohexitols des urines humaines et en séparer une fraction riche en ces substances.

Il a extrait de 10 litres d'urine humaine un cyclohexitol cristallisé fondant vers 340°-350°, qu'il n'a pu identifier avec certitude au scyllitol, faute d'un échantillon de comparaison.

Nous nous sommes proposé de compléter et d'étendre ces recherches. Aussi avons-nous été amené à appliquer les techniques chimiques et microbiologiques à l'étude des cyclohexitols des urines de l'homme et d'un certain nombre de Mammifères.

Dans un premier groupe d'essais nous avons pu montrer la présence dans ces diverses urines de substances oxydables, par l'acide périodique comme les cyclohexanehexols. L'une des plus riches était une

urine de sanglier. Nous avons réussi à en extraire un cyclitol qui a été identifié au scyllitol, isomère stéréochimique du mésoinositol ; par la suite, nous avons pu également isoler ce même scyllitol à partir d'un mélange d'urines humaines.

A partir des urines de l'homme et du sanglier ; les eaux mères de cristallisation du scyllitol contenaient des cyclitols, oxydables par l'acide périodique et favorisant la croissance du Neurospora. Ceci laissait supposer la présence de mésoinositol associé au scyllitol dans ces urines, mais malgré de multiples essais nous n'avons pu réussir à séparer le mésoinositol sous forme pure.

Pendant que se poursuivaient ces recherches, M. P. Malangeau dans le même laboratoire, réussissait à mettre au point une technique sélective de caractérisation du mésoinositol par la chromatographie sur papier.

Le protocole opératoire de P. Malangeau permet de séparer les cyclohexanehexols isomères et, en particulier, le mésoinositol et le scyllitol. Nous avons appliqué sa technique à diverses urines animales où nous avons pu identifier régulièrement du mésoinositol et, dans environ un tiers des urines étudiées, le scyllitol associé.

Avant de procéder à la description de nos résultats, nous désirons exprimer notre respectueuse reconnaissance au Professeur P. FLEURY qui nous a accueilli dans son laboratoire, nous a confié le sujet de ce travail et en a suivi sa réalisation. Nous tenons à lui exprimer toute notre profonde et déférente gratitude pour l'intérêt qu'il n'a cessé de nous prodiguer. Nous tenons également à exprimer notre plus vive reconnaissance au Professeur M.M. JANOT à qui nous lie une amitié datant de ses années d'Internat. Il nous a vivement encouragé à entreprendre et à poursuivre l'élaboration d'une thèse et, au cours de nos années de recherches, il nous a constamment témoigné sa sollicitude ; il a mis à notre disposition l'appareillage de son laboratoire pour réaliser certaines purifications. Nous sommes profondément touché qu'il ait accepté de faire partie du jury de cette thèse et nous tenons à lui exprimer notre profonde et amicale gratitude.

Ce travail fut réalisé sous la direction de notre ami J. E. COURTOIS ; nous lui exprimons notre plus vive reconnaissance pour tous les conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer tout au long de notre séjour au laboratoire de Chimie Biologique où, dans une ambiance sympathique, furent réalisés nos essais.

Nous voulons associer à nos remerciements Monsieur E. Cattelain, Docteur ès-Sciences Physiques, Assistant de la Chaire de Chimie Biologique lorsque nous avons commencé l'élaboration de ce travail et qui nous a toujours témoigné une grande bienveillance.

Au cours de la dernière partie de ce travail, M.P. Malangeau Assistant de la Chaire de Chimie Biologique, nous a obligeamment initié à l'emploi des techniques chromatographiques sur papier. Il nous a fait profiter de sa grande expérience en ce domaine et n'a pas hésité à reproduire à notre intention certains essais délicats importants. Nous tenons à lui exprimer toute notre vive reconnaissance.

Chapitre I

HISTORIQUE

L'inositol a été isolé, pour la première fois, par J.SCHERER (22) en 1850.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de ce corps. Un exposé très complet nous en est fourni par la monographie de P.FLEURY et P. BALLATRE : "Les inositols" (6) à laquelle nous empruntons les détails ci-dessous.

Le sujet auquel nous nous sommes proposé d'apporter une contribution : l'Inosurie (terme créé par Gallois dans sa thèse de médecine en 1864) n'a été abordé qu'en 1856 par Cloetta qui, après avoir extrait l'inositol du rein total de boeuf, pensa qu'il pouvait retrouver cette substance dans l'urine.

Ses premiers essais, sur des urines d'homme sain, ne lui donnèrent pas de résultat positif. Un nouvel essai sur des urines d'homme atteint de la maladie de Bright, lui permit d'isoler, "avec toute certitude" dit-il, l'Inositol.

L'inositol a été ensuite extrait de l'urine de diabétique par Newkomm en 1857.

En 1858, Vohl ayant constaté chez un diabétique, et au cours du traitement, que en même temps que la proportion de glucose et d'urée diminuait la proportion d'inositol augmentait, avait pensé que le glucose se transformait en inositol. Il voulut reproduire artificiellement cette transformation à partir du "sucre de raisin" - selon son expression - mais sans aucun résultat.

Jusque là, la plupart des auteurs, dont Cloetta, Gallois Cechot, n'ont pas isolé d'inositol des urines normales.

En 1868, Danhardt en retire 0,10 g. de 16 livres d'urine de boeuf, (soit environ 8 Kgs).

En 1908 Starkenstein et en 1909 Hoppe Seyler peuvent affirmer que ce corps se trouve dans l'urine normale "à l'état de trace" disent-ils.

Vers 1908 G. Meillère et ses élèves dont notre Maître P.FLEURY reprirent le problème de l'Inosurie. Mais malgré une amélioration de la réaction de caractérisation, l'absence d'une méthode de dosage sélective leur fit abandonner le problème vers 1910.

En 1929, P. FLEURY reprenant le problème de l'inositol, en général recherche d'abord une méthode de dosage avec J. MARQUE (12). Il utilisa le pouvoir réducteur de ce corps en milieu alcalin sur l'iodo-mercure de potassium, par analogie avec l'action de divers polyols acycliques et sucres sur ce même réactif.

L. YOUNG en 1934 et GREGORY, en 1935, utilisèrent cette méthode qu'ils adaptèrent au dosage de petites quantités d'inositol. Le défaut de cette méthode est son manque de spécificité. L'iodomercurate en milieu alcalin (réactif de Nessler) réagissant de façon semblable sur les polyols linéaires. Mais s'il est facile d'éliminer les oses, il était beaucoup plus difficile, à cette époque, de séparer les cyclitols des polyols linéaires et, par conséquent, de doser les uns en présence des autres.

C'est alors qu'à partir de 1930 P. FLEURY avec J. LANGE (16) mit au point une méthode de dosage basée sur l'oxydation de l'inositol par l'acide periodique. La réaction est complexe mais, pratiquée dans des conditions déterminées, elle se montrait assez régulière pour permettre un dosage.

Elle fut employée par B. S. PLATT et G. E. GLOCK en 1943 au cours de leurs recherches sur la teneur en inositol de divers tissus animaux.

Cette méthode représentait un progrès notable comparativement à la méthode de l'iodomercurate mais, comme cette dernière elle avait le défaut du manque de spécificité, les autres corps à groupement α -glycol se trouvant également oxydés.

Une grosse amélioration fut apportée par P. FLEURY et Melle M. JOLY (maintenant Mme RAOUL) en 1937 (10) en éliminant les oses par action de la magnésie qui les détruit à 100° sans attaquer les cyclitols (mais sans attaquer non plus les polyols linéaires).

Devant ces résultats insuffisants, P. FLEURY reprit complètement l'étude de l'oxydation de l'inositol par l'acide periodique avec G. POIROT et Mme Y. Fievet-Guinard (13).

Il apparut alors que cette réaction diffère profondément de celle que l'on observe avec les polyols linéaires.

L'oxydation a lieu en deux phases : une première phase rapide (quelques minutes) avec consommation de 4 molécules d'acide periodique et formation d'acide formique reconnu primitivement et l'acide glycolique dont la présence n'était pas prévue. La deuxième phase, beaucoup plus lente (plusieurs jours), s'accompagne d'un dégagement de gaz carbonique corrélatif d'une augmentation de l'acide formique et d'une diminution de l'acide glycolique.

A partir de ces données P. FLEURY pensa qu'il devait être possible d'utiliser pour un dosage spécifique de l'inositol le dégagement de gaz carbonique, ce qui distinguait totalement ce corps des polyols linéaires. Dans une étude faite avec son élève A. RECOULES (14) il observa que le dégagement de gaz carbonique mesuré par la méthode manométrique de Warburg était suffisamment régulier et proportionnel à la concentration en inositol de la solution pour en déduire la quantité de polyols mise en réaction. L'expérience a montré également que la proportionnalité reste très satisfaisante en faisant la mesure du gaz libéré après quatre heures d'oxydation.

Bien entendu il faut éliminer les autres corps susceptibles de donner par oxydation periodique un dégagement d'acide carbonique. Nous en exposerons la technique plus loin.

D'autre part, la courbe tracée d'après la cinétique du dégagement présente une allure qui permet une caractérisation de l'inositol. C'est cette méthode que nous avons employée principalement pour tous nos dosages d'Inositols dans les urines et dans les liquides d'extraction obtenus aux différents stades de nos essais d'isolement des polyols cycliques urinaires.

Chapitre II

METHODES DE DOSAGE ET DE CARACTERISATION DES INOSITOLS

que nous avons employées au cours de ce travail.

I - DOSAGE VOLUMETRIQUE basé sur l'oxydation par l'acide periodique.

- Méthode de P. FLEURY et Mlle M. JOLY (10).

Le principe de cette méthode consiste à faire réagir sur la solution d'Inositol à doser une quantité connue en excès d'acide périodique en solution titrée.

Après un certain temps de contact à la température du laboratoire, on dose l'acide periodique qui n'a pas été réduit. Cette détermination se fait par double retour. On ajoute un excès connu d'anhydride arsénieux qui réduit l'acide periodique (l'addition d'iodure de potassium accélère cette réaction) et on titre par l'iode l'anhydride arsénieux non oxydé.

D'après J. LANGE (16) l'oxydation periodique de l'Inositol nécessiterait six atomes d'oxygène par molécule d'Inositol.

Mlle M. JOLY (15) indique une consommation en oxygène de 6,5 à 6,8 atomes.

D'après Mme Y. FIEVET-GUINARD (3) l'oxydation est lente et, après contact prolongé, il a été consommé 6,7 atomes, mais le terme de l'oxydation demande un temps de contact très long et fonction de la température. A 0° la réaction n'a été complète qu'au bout de trente jours, alors qu'à 50° le terme était atteint à six heures.

Pour nos dosages, nous avons suivi le protocole opératoire adopté par A. RECOULES (21) qui permet de réduire le temps de contact en effectuant parallèlement la même réaction sur une solution titrée d'inositol. En opérant, soit à 37°, soit à la température du laboratoire, la réduction de l'acide periodique est proportionnelle après un délai de douze à vingt quatre heures, à la quantité de cyclitol mise en oeuvre.

Voici le détail de ce protocole opératoire tel que l'indique A. RECOULES (21).

- erlenmeyer N° 1 : témoin acide periodique :

Sol. N/10 d'acide periodique..... 10 cm³

- erlenmeyer N° 2 : témoin inositol :

Inositol : 10 cm ³ de sol. à 0,9 gr. p. 1000	$\frac{(M)}{200}$
Sol. N/10 d'acide periodique.....	10 cm ³

- erlenmeyer N° 3 : essai

Corps ou solution à doser	Q.S.
(voisine de...	10 cm ³

Sol. d'acide periodique N/10	10 cm ³
------------------------------------	--------------------

Les 3 erlenmeyer sont bouchés et placés à l'étuve à 37° au moins pendant 12 heures.

Ajouter ensuite, et dans l'ordre, dans chaque flacon :

Solution de bicarbonate de potasse à 20 %/o	10 cm ³
---	--------------------

Solution bicarbonatée d'anhydride arsénieux N/10.....	15 cm ³
---	--------------------

Solution d'iode de potassium à 20 %/o	0,5 cm ³
---	---------------------

Laisser à la température du laboratoire pendant environ 15 minutes (l'iode de potassium joue le rôle de catalyseur de la réaction : acide periodique - anhydride arsénieux). Verser à la burette une solution d'iode N/10 jusqu'à teinte jaune, ou si l'on ajoute à la fin du dosage quelques gouttes d'empois d'amidon, jusqu'à virage de l'amidon.

On obtient ainsi trois volumes x d'iode consommé :

erlenmeyer N° 1 :	x ₁	cm ³
"	N° 2 :	x ₂ cm ³
"	N° 3 :	x ₃ cm ³

Le premier volume x₁ représente le titrage de la solution d'acide periodique employée. Si cette solution est exactement N/10, on versera 15 - 10 = 5 cm³ d'iode N/10. En réalité cette solution n'est pas toujours exacte d'où la nécessité d'un témoin.

Dans le deuxième erlenmeyer, l'acide periodique ayant oxydé 9 mg d'inositol, est partiellement réduit. Il restera donc une quantité plus grande d'anhydride arsénieux en excès que dans l'erlenmeyer N° 1. Cette quantité sera donnée par x₂. La différence x₂ - x₁ = n indiquera donc le volume d'acide periodique N/10 consommé par 9 mg d'inositol.

Dans l'exemple étudié une molécule d'inositol (180 g) consomme environ 6,5 atomes d'oxygène (65.000 cm³ de solution N/10 d'acide periodique).

18 mg d'inositol demandent donc pour leur oxydation 6,5 cm³ d'acide periodique N/10. La quantité d'acide periodique utilisée (10 cm³) suffit pour oxyder environ 20 mg d'inositol car l'acide periodique doit toujours être en excès.

Dans le troisième erlenmeyer où, nous venons de le voir, le poids d'inositol ne doit pas dépasser 20 mg, le raisonnement employé

pour le deuxième erlenmeyer s'applique intégralement. La différence $x_3 - x_1 = n'$ représente le volume d'acide périodique N/10 consommé par le poids inconnu d'inositol.

Une simple règle de trois donnera ce poids :

$$p = \frac{9 \times n'}{n}$$

Effectué ainsi tout dosage d'inositol en solution pure devient rapide et précis et ne nécessite que des réactifs et du matériel d'un usage courant dans les laboratoires.

Malheureusement si, en même temps que l'inositol, existe un autre composé oxydable par l'acide périodique le dosage devient erroné, et aucune propriété spécifique de l'inositol n'étant mise en évidence il est impossible de s'apercevoir de l'erreur commise.

II - DOSAGE MANOMETRIQUE à l'aide de l'appareil de Warburg. ⁽¹⁾

L'appareil de Warburg fut employé pour l'étude de l'action de l'acide périodique sur l'inositol par Mme Y. FIEVET-GUINARD, qui nous en a donné la description ainsi que la technique d'étalonnage et d'emploi(3).

A. RECOULES a simplifié le processus d'utilisation en opérant par comparaison avec une solution titrée d'inositol. Dans ces conditions, en rapportant les dénivellations lues à un volume théorique standard de 20 cm³ pour tous les flacons, les dénivellations ainsi rectifiées seront comparables entre elles et le dosage de la solution étudiée sera obtenu par une simple règle de trois.

En représentant graphiquement (courbe I) la cinétique des pressions de CO₂ étudiée sur différentes concentrations en mésoinositol, il remarqua que ces courbes étaient superposables en changeant l'échelle de l'axe des ordonnées. Il obtint ainsi une courbe type caractéristique du méso-inositol. Les dénivellations n'augmentant pratiquement plus après la quatrième heure, en opérant à 30°, le dosage peut s'effectuer en quatre heures.

Voici les détails de l'opération selon l'auteur :

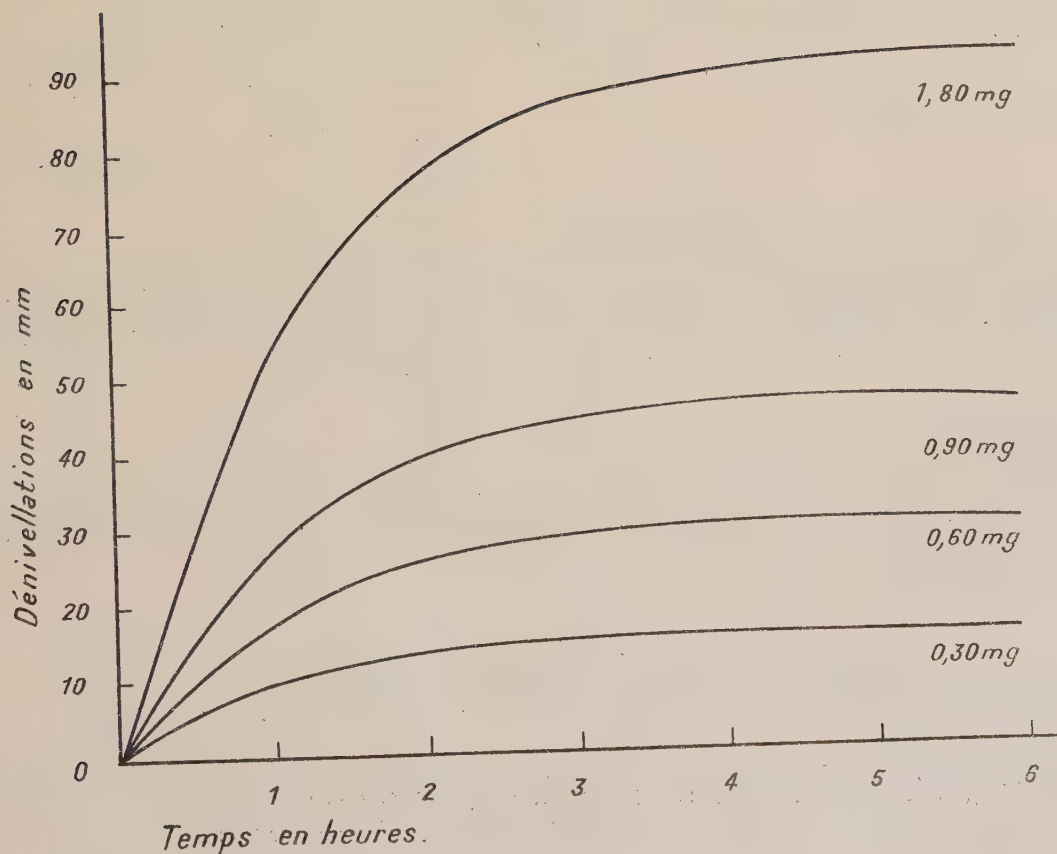
"La solution à doser devra contenir plus de 0,1 mg d'inositol par cm³ et moins de 2 mg. Plusieurs manomètres de Warburg seront employés simultanément pour ce dosage. Chacun d'eux recevra 1 cm³ de la solution à doser dans le flacon central et 1 cm³ de la solution N/2 d'acide périodique dans l'ampoule latérale.

(1) Nous exprimons nos sincères remerciements à Mme L. Le DIZET qui a bien voulu nous initier au maniement délicat de l'appareil de Warburg, et qui nous a apporté le concours de son habileté expérimentale dans l'exécution de plusieurs dosages manométriques.

COURBE I

Dénivellations en mm, en fonction du temps, observées à l'appareil de Warburg, par oxydation periodique de solutions de m-inositol à différentes concentrations.

(d'après A. RECOULES.)



"Les manomètres seront plongés dans le thermostat réglé à 30° pendant au moins 20 minutes avant le début de l'essai. Le mélange des deux solutions, les robinets fermés, marque le commencement du dosage. Le mécanisme agitateur de l'appareil de Warburg sera maintenu en marche pendant quatre heures. Toutes les trente minutes on note la dénivellation existant dans chaque manomètre. Les chiffres obtenus seront ramenés au volume standard de 20 cm³ et on calculera leur moyenne.

"Ces résultats permettent de tracer la courbe des dénivellations en fonction du temps. D'après la dénivellation atteinte à la quatrième heure, par une simple règle de trois, on peut savoir la quantité d'inositol existant par cm³ de la solution à doser. La courbe théorique, pour cette quantité d'inositol, doit se superposer à la courbe obtenue sur l'inositol a bien été le seul corps dégageant du gaz carbonique sous l'action de l'acide periodique."

A. RECOULES a étudié un seul isomère : le méso-inositol, qui a donné une courbe caractéristique. Nous avons repris ces essais en suivant le même processus opératoire, et en les appliquant aux différentes isomères de l'inositol que nous avons pu nous procurer : méso-inositol, d-inositol, l-inositol, inositol racémique et scyllitol.(1)

(1) - Le méso-inositol :



F° 224°

provenait des Laboratoires Allard.

Tous les autres isomères nous ont été obligeamment procurés par le Professeur H. HERISSEY à qui nous exprimons notre profonde et respectueuse gratitude.

- Le d-inositol :



F° 246°

préparé par déméthylation du pinitol à l'aide de l'acide iodhydrique

- Le l-inositol :



F° 246°

obtenu par déméthylation iodhydrique du québrachitol extrait du Grevillia robuste.

- L'inositol racémique, en faisant cristalliser un mélange de solutions équimoléculaires de d-inositol et de l-inositol.

- Le scyllitol :



F° 247°

F° 348°

obtenu par réduction du scyllomésosinosose selon la méthode de Th. POSTERNAK (20). Le scyllomésosinosose a été préparé en oxydant biochimiquement le méso-inositol par Acétobacter suboxydans.

(Suivant l'usage habituel, les lignes verticales représentent les groupes hydroxyles. Nous avons adopté les schémas de représentation proposés par FLETCHER, ANDERSON et LARDY (4) dans leur projet de nomenclature des cyclohexitols).

Pour chacun des corps étudiés, nous avons opéré sur des prises d'essai de 1,80 mg - 0,90 mg - 0,45 mg que nous avons mises en solution dans 1 cm³ d'eau distillée et soumises dans l'appareil de Warburg à l'action de 1 cm³ de solution N/2 d'acide periodique, la température du thermostat étant réglée à 29°.

Nous avons réuni dans le tableau I les chiffres représentant les dénivellations obtenues avec les différentes doses de chacun de ces corps.

Nous remarquons que les résultats donnés par chaque isomère sont pratiquement semblables et que si nous voulions tracer, pour chaque corps étudié, une courbe représentant les variations de pression de CO₂ en fonction du temps, ces courbes seraient identiques et superposables à celles qu'avait obtenues A. RECOULES.

Il convient cependant de remarquer qu'au début de la réaction le scyllitol est oxydé un peu plus lentement.

FLEURY, COURTOIS et BIEDER (8) ont pu déterminer la vitesse initiale de l'oxydation périodique de ces cyclohexitols. En opérant à 0° en présence d'éthanol qui ralentit la vitesse d'oxydation les cyclohexitols qui possèdent des hydroxyles vicinaux contigus sont attaqués plus rapidement que le scyllitol dont les hydroxyles voisins sont situés alternativement de part et d'autre du plan.

Ainsi, la présence d'hydroxyles contigus en cis accélère la vitesse initiale d'oxydation mais n'influe plus sur les phases ultérieures génératrices d'anhydride carbonique.

Tableau N.º I

Dégagement d'anhydride carbonique par oxydation périodique de divers cyclohexols.
Dénivellation en mm observées à l'appareil de Warburg, en fonction du temps, à + 29°.

Temps en heures		Poids en mg de :														
		Mésoinositol			d-inositol			l-inositol			Inositol racémique			Scyllitol		
		0,45	0,90	1,80	0,45	0,90	1,80	0,45	0,90	1,80	0,45	0,90	1,80	0,45	0,90	1,80
1	11	21	41,5	10	20,5	40,5	9,5	19,5	39	10,5	21	42	9	18	37	
2	16	33	65	16	32,5	64	16	32,5	64,5	16,5	32	65	15	31	63	
3	20	40	79	19,5	39	80	20	40,5	80,5	20,5	41	81	20	39	80	
4	20,5	40,5	81	20	40	80	20,5	41	81	21	41,5	81,5	20,5	40	81	

DIFFERENCIATION DU MESOINOSITOL ET DU SCYLLITOL.

L'oxydation periodique ne permet pas de différencier le scyllitol du mésoinositol. C'est pourquoi en vue de différencier les inositols isomères, nous avons procédé à des essais microbiologiques.

G. W. BEADLE (1) a décrit un mutant de *Neurospora Grassa* (Ascomycètes) qu'il obtint par irradiation ultra-violette.

Le mésoinositol est un facteur de croissance essentiel agissant quantitativement sur ce mutant dénommé de ce fait "Inositolless". Cette souche de *Neurospora* constitue un test de choix, relativement très spécifique, pour la détermination quantitative du mésoinositol.

Nous avons utilisé la technique décrite par W.H. SCHOPPER (1) Th. POSTERNAK et Mlle M. L. BOSS (24).

MILIEUX DE CULTURE ET TECHNIQUE DE PREPARATION

Nous distinguerons le milieu de conservation du milieu de culture utilisé pour les essais quantitatifs.

1°- Milieu de conservation de la souche (Mout-Agar) :

Agar.....	20 g
PO ₄ KH ₂	2,50 g
SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	0,50 g
ClNa	0,10 g
Asparagine	0,10 g
Glucose	5 g
Eau distillée q.s.p.	1.000 cm ³

Préparation : Dans un ballon de un litre on délaie les 20 g d'Agar en paillettes finement coupées avec 500 g d'eau distillée. Pour obtenir une dissolution aussi complète que possible on bouche le ballon au coton cardé

(1) Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur W.H. SCHOPFER qui nous a procuré les souches de *Neurospora*. Nous désirons aussi remercier Mlle M.L. BOSS qui, lors d'un stage dans le Laboratoire du Professeur Y. RAOUL, nous a fort aimablement initié à la pratique du test au *Neurospora* et nous a indiqué les détails techniques pour la préparation des milieux de culture.

et on le place dans un autoclave ; on porte à la température de 110° pendant quinze minutes. On filtre à chaud sur gaze dans un ballon de 1.500 cm³. On dissout successivement les autres produits dans 200 ou 300 cm³ d'eau distillée chaude et on ajoute cette solution à la première partie.

D'un autre côté, on stérilise à l'autoclave à 110°-115° 150 à 200 cm³ de moût bière. (1) Il se produit un précipité. Après refroidissement on laisse decanter. On recueille 100 cm³ de liquide clair que l'on ajoute au ballon contenant déjà en solution l'Agar et les autres produits. Enfin on ajoute 40 mg de méso-Inositol dissous dans un peu d'eau, et on complète à 1100 cm³ avec de l'eau distillée.

Le liquide chaud est réparti dans des tubes à essai à raison de 15 à 20 cm³ par tube. Ceux-ci sont bouchés au coton cardé, puis stérilisés 15 minutes à l'autoclave à 115° deux fois à 24 heures d'intervalle.

A la sortie de la deuxième stérilisation ces tubes sont inclinés et on laisse refroidir. Après solidification ils sont munis d'un capuchon de caoutchouc et conservé dans un endroit frais pour éviter la dessiccation.

Il faut prévoir un nombre de tubes permettant un repiquage tous les 15 jours environ, pendant tout le temps que dureront les expériences. Chaque repiquage se fait sur deux ou trois tubes à chaque fois car il peut se trouver que des cultures soient envahies par des moisissures étrangères et, de ce fait rendues inutilisables.

Il ne faut pas non plus préparer un trop grand nombre de tubes car après deux ou trois mois au maximum les milieux sont trop desséchés pour permettre le développement du Neurospora.

Ensemencement : L'ensemencement se fait en laissant tomber la surface du milieu quelques spores prélevés, à l'aide d'une cause de platine, sur la culture précédente.

Ces opérations doivent être pratiquées au dessus d'une flamme de bec Bunsen pour éviter les souillures des milieux par des spores étrangères apportées par l'air.

La culture se fait à une température comprise entre 25° et 29°.

2°- Milieu de culture pour les essais d'inositol.

Milieu liquide de formule :

Glucose	15 g	
Tartrate neutre d'ammonium.....	5 g	
Nitrate d'ammonium.....	1 g	
PO ₄ KH ₂	2,50 g	
SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	0,50 g	
ClNa	0,10 g	
Cl ₂ Ca, 6 H ₂ O	0,10 g	
Cl ₅ Fe	5 mg	
SO ₄ Zn, 7 H ₂ O	2 mg	
d-l-Biotine.....	2 γ	
Eau distillée q.s.p.		1.000 cm ³

(1) Le moût de bière nous a été fourni par la Brasserie DEMORY, Rue Broca à PARIS.

Préparation : On dissout dans 500 à 600 cm³ d'eau distillée les corps suivants : glucose, nitrate d'ammonium, phosphate acide de potassium, sulfate de magnésium et chlorure de sodium. On filtre si le liquide n'est pas très limpide.

D'autre part, on dissout séparément dans un peu d'eau chacun : le chlorure de calcium, le perchlorure de fer⁽¹⁾, le sulfate de zinc⁽²⁾ et la biotine⁽³⁾. On les ajoute successivement à la première solution. On stérilise alors le liquide obtenu 15 minutes à 115° et on répartit en Erlenmeyer. (On emploie des Erlenmeyer de 90 à 100 cm³ et on met dans chacun 20 à 25 cm³ de liquide) on les stérilise 15 minutes à 115°.

Enfin, on préparera une solution de tartrate d'ammonium à 25 pour cent qui sera stérilisée à part. On ajoutera, à l'aide d'une pipette stérile, cette solution au milieu de culture à raison de 0,4 cm³ par flacon seulement au moment de l'ensemencement. D'autre part les cyclitols à essayer seront dissous à part et les solutions stérilisées 15 minutes à 115°.

La culture du Neurospora sur moût agar peut-être employée dès qu'elle a recouvert toute la surface du milieu et qu'elle offre l'aspect d'une couche pulvérulente rose.

On en prélève une petite quantité à l'extrémité d'un fil de platine formant une boucle de un à deux mm de diamètre que l'on délaie dans 10 cm³ d'eau distillée stérile. On agite suffisamment pour obtenir une suspension bien homogène avant de répartir dans les erlenmeyer.

Chaque ensemencement se fera en deux ou trois exemplaires car il arrive souvent que des flacons soient envahis par des éléments mycéliens étrangers et ne peuvent servir à l'expérience.

Disposition de l'expérience :

Dans une première série de six flacons, numérotés de 1 à 6, et contenant chacun 25 cm³ de liquide de culture stérile, on ajoutera : 0,4 cm³ de la solution stérile de tartrate d'ammoniaque, puis respectivement 0, 50 γ, 75 γ, 100 γ, 200 γ, et 1000 γ de mésoinositol en solution à 1/2.000 soit en volume : 0,1/10^e cm³, 1,5/10 cm³, 2/10 cm³, 4/10 cm³ et 2 cm³.

-
- (1) Pour le FeCl₃ on emploie 0,05 cm³ d'une solution à 10 pour cent. La solution que l'on trouve communément est à D: 1,26 et contient 26 % de FeCl₃ pur. On en prend 10 cm³ auxquels on ajoute 16 cm³ d'eau distillée, ce qui donne une solution à 10 %.
 - (2) Pour le sulfate de zinc, on prendra 0,1 cm³ d'une solution à 2 %.
 - (3) Pour la biotine, on en pèse 1 mg que l'on dissout dans 10 cm³ d'eau distillée (solution à 1/10.000). Un cm³ de cette solution (soit 0,1 mg) est amené à 100 cm³ avec de l'eau distillée. La solution finale contient donc 1 γ pour un cm³. Nous en prendrons 2 cm³ pour 1.000 cm³ de notre milieu.

et, enfin, dans chaque flacon : 1 cm³ de suspension de spores de *Neurospora*.

Cette série constituera l'essai témoin.

Une deuxième série de six flacons, numérotés de 1' à 6' sera préparée d'une façon identique, mais en remplaçant le mésoinositol par le cyclitol à étudier.

Les erlenmeyer sont placés trois ou quatre jours à l'obscurité et à une température de 24 à 29°.

Au bout de ce temps on observe des cultures de coloration blanc rosé recouvrant la surface du liquide dans chaque flacon.

A première vue on peut déjà se rendre compte de l'importance des variations dans le développement des cultures; en particulier on peut noter si les différentes doses du corps essayé produisent un effet comparable au mésoinositol ou si ces doses n'ont pas donné plus de développement qu'on en obtient dans le flacon témoin sans addition de mésoinositol.

Pour une appréciation plus exacte, on recueille les thalles sur un filtre taré placé sur un petit Buchner relié à une trompe à vide. On élimine le liquide nutritif et on rince à plusieurs reprises à l'eau distillée. On enlève le filtre sur lequel s'est appliquée la pellicule de thalle et on le dessèche à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant. (Il faut environ une à deux heures d'étuve).

On laisse refroidir dans un dessiccateur et on pèse. On déduit le poids du filtre. On peut aussi opérer exactement selon le protocole suivi par Mlle M. L. BOSS : détacher le thalle du papier filtre et en faire une boulette que l'on sèche et pèse.

Sur un même graphique on trace la courbe correspondant au produit à essayer et la courbe correspondant au mésoinositol. On peut également dresser un tableau des résultats obtenus de part et d'autre.

Cette méthode permet :

1°- Le dosage d'une solution de mésoinositol par comparaison avec une solution de titre connu en mésoinositol.

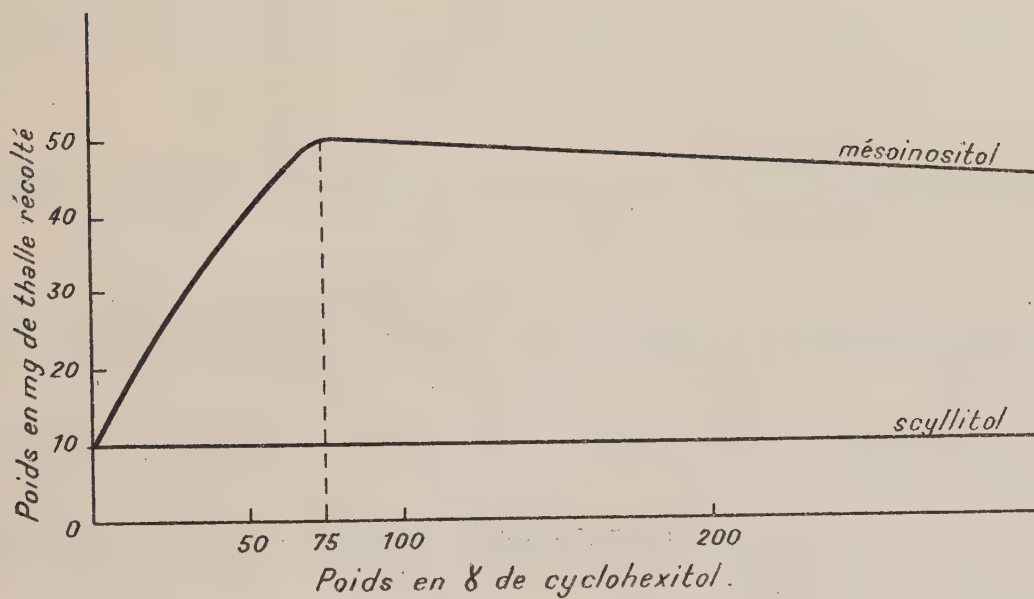
La courbe représentative des poids de thalle récoltés est assez caractéristique (courbe II). Pour 25 cm³ de liquide de culture, nous observons un accroissement rapide jusqu'à la dose de 75 γ de mésoinositol ; la courbe décroît ensuite, très lentement, pour des doses de plus en plus élevées.

2°- Une différenciation du mésoinositol et du scyllitol ; ce dernier n'ayant aucune action sur la croissance du *Neurospora* (courbe II).

COURBE II

POIDS EN MMG DE THALLE SEC DE NEUROSPORA CRASSA RECOLTE EN
FONCTION DU POIDS EN γ DU CYCLOHEXITOL AJOUTE AU MILIEU DE
CULTURE. (1°- mésoinositol ; 2°- scyllitol.)

(Moyenne de plusieurs essais)



DOSAGE DE L'INOSITOL DANS L'URINE

Purification de l'extrait analysé.

Nous venons d'exposer les méthodes employées pour le dosage d'une solution d'inositol, c'est-à-dire d'un extractum urinaire représentant la plus grande partie des inositols contenus dans le volume d'urine traitée.

A. RECOULES a mis au point une technique dont les principales phases peuvent se subdiviser en :

1°- Extraction des Inositols d'un volume connu d'urine :

Les polyols sont entraînés par la baryte alcoolique, puis libérés du précipité par l'acide sulfurique. Les polyholosides entraînés sont hydrolysés par chauffage en milieu acide. Les oses initialement présents ou libérés au cours de cette hydrolyse sont détruits par chauffage avec de la magnésie ; les produits acides résultant de la dégradation magnésienne sont éliminés par extraction éthéro-alcoolique.

2°- Dosage par l'intermédiaire de l'acide periodique, soit volumétrique, soit manométrique d'une partie connue de cet extrait. (Le dosage manométrique sera préféré puisque comme nous l'avons déjà exposé, il présente une sélectivité supérieure).

3°- Calculs pour rapporter à un litre d'urine la quantité trouvée dans le volume traité, en tenant compte des pertes d'Inositols subies au cours des manipulations d'extraction.

TECHNIQUE : 50 cm³ d'urine sont saturés par agitation avec de la baryte hydratée.

La proportion de 10 g d'hydrate de baryum pour 50 cm³ d'urine, indiquée par A. RECOULES, peut être abaissée à 5 g car il en reste un grand excès non dissous.

Après un quart d'heure de repos, nouvelle agitation et filtration.

On prélève 28 cm³ de liquide clair que l'on répartit dans 8 tubes à centrifuger, bouchant à vis, d'une contenance de 35 cm³, soit 3,5 cm³ de liquide dans chaque tube.

On complète le volume dans chaque tube à 35 cm³ avec de l'alcool à 95° et on mélange par agitation.

Les tubes sont alors portés, 24 heures au moins, à basse température (0° à 4°) dans un réfrigérateur après quoi on les soumet pendant 10 minutes, à une centrifugation rapide (4000 t/m).

Les tubes sont alors renversés et on les laisse égoutter. On recueille le liquide alcoolique pour récupération. Le précipité barytique ayant entraîné, entre autre, glucides et inositols, reste fixé au fond des tubes. On le délave, à l'aide d'un agitateur, avec 2 à 3 cm³ d'eau distillée ajoutée à chaque tube ; on obtient une dissolution presque totale. On ajoute alors dans chaque tube, III à IV gouttes d'acide sulfurique pur qui précipite le baryum en sulfate insoluble.

Le liquide reste très acide par l'excès d'acide sulfurique.

On transvase dans un seul tube le contenu des autres et on centrifuge 10 minutes à 4000 t/m. Le liquide limpide est versé dans un petit cristalliseur à bec.

On rince les tubes avec quelques cm³ d'eau distillée - on délave le précipité du tube centrifugé avec l'eau de rinçage et on centrifuge à nouveau.

Le liquide clair obtenu est versé dans le cristalliseur.
(Nous sommes toujours en milieu très acide).

Le cristalliseur est porté 30 minutes sur un bain-marie bouillant, en vue de l'hydrolyse des polyholosides qui peuvent avoir été entraînés.

Il faut éviter une trop grande évaporation qui pourrait provoquer une concentration en acide sulfurique et le noircissement du liquide. Pour cela on peut ajouter de temps en temps 1 ou 2 cm³ d'eau distillée.

Le liquide, après refroidissement, est neutralisé par la soude jusqu'à un pH d'environ 6,5 et ramené au volume de 10 cm³ par addition d'eau distillée. A ce stade, il faut se débarrasser des glucides préexistants ou libérés par hydrolyse comme nous l'avons déjà exposé, nous employons la destruction par la magnésie.

Les 10 cm³ de liquide sont introduits dans un erlenmeyer, on y délave 5 g de magnésie récemment calcinée au moins deux heures vers 800° et on porte dans un bain-marie bouillant, en adaptant l'erlenmeyer à un réfrigérant à reflux, pendant 30 minutes.

L'erlenmeyer est alors retiré et refroidi sous courant d'eau.

On ajoute 15 cm³ d'eau distillée et on soumet à l'agitation pendant 1 heure, à l'aide d'un agitateur mécanique après quoi on centrifuge le contenu de l'erlenmeyer 10 minutes à 4000 t/m.

Le liquide limpide est recueilli dans une éprouvette et mesuré. On note le volume; il est ensuite introduit dans un tube à centrifuger de 30 à 40 cm³ en vue de l'évaporer à siccité.

A. RECOULES plonge le tube dans un bain-marie bouillant et fait arriver à la surface du liquide un courant d'air chaud. Nous avons trouvé plus rapide d'effectuer l'évaporation, toujours en bain-marie bouillant,

mais le tube étant fermé par un bouchon à deux trous. Un de ces trous est muni d'un tube relié à la trompe à vide (évaporation sous vide partiel). Pour faciliter l'obtention d'un extrait pulvérulent, nous avons dissous dans le liquide, avant l'évaporation, environ 0 gr.50 de sulfate de soude cristallisé.

Lorsque le liquide est presque entièrement évaporé, le tube est porté une heure à deux heures à l'étuve à 100° puis, à l'aide d'une baguette de verre, on pulvérise le résidu.

Il faut se débarrasser des acides organiques préexistants et des acides produits par le traitement à la magnésie.

Nous ajoutons alors, sur le résidu pulvérulent le mélange extractif qui, après de nombreux essais préliminaires, a donné les meilleurs résultats à A. RECOULES.

Ether	8 cm ³
Alcool absolu	2 cm ³
Acide sulfurique	x gouttes.

Après agitation, on porte quelques secondes au bain-marie bouillant jusqu'à ébullition du liquide. On bouche bien le tube et on le maintient au réfrigérateur jusqu'au lendemain.

On centrifuge alors le tube et on rejette le liquide.

On ajoute 3 à 4 cm³ d'eau distillée sur le résidu, on porte au bain-marie jusqu'à dissolution et cessation d'effervescence. On recueille la solution dans un vase jaugé de 5 cm³ et on complète le volume à 5 cm³ avec de l'eau distillée.

C'est sur un cm³ de cette solution que l'on effectuera le dosage, après oxydation périodique, soit volumétrique, soit manométrique à l'aide de l'appareil de Warburg.

Nous avons exposé les détails de ces deux techniques.

Il nous faut maintenant calculer la quantité d'inositols contenue dans un litre de l'urine étudiée.

Cette quantité nous est donnée par la formule suivante établie par A. RECOULES (en mg.)

$$\frac{1.200 (p e + n)(b + c)}{a d}$$

a = volume d'urine traité : 28 cm³

b = volume de liquide traité par la magnésie

c = volume d'eau ajouté à b avant agitation

d = volume évaporé

e = volume du liquide après dissolution de l'extrait sec
(5 cm³)

p = poids d'inositol dosé dans 1 cm³ de liquide e

n = poids d'inositol perdu par extraction à l'alcool-éther
acide (Tableau II).

TABLEAU II

POIDS en MG D'INOSITOL PERDU (n) CORRESPONDANT A POIDS
D'INOSITOL DOSE DANS L'EXTRAIT URINAIRE PAR LA
METHODE EXPOSEE (d'après A. RECOULES)

Inositol introduit en mg	Inositol retrouvé en mg	n = Inositol perdu en mg
0,30	0,20	0,10
0,40	0,26	0,14
0,50	0,33	0,17
0,60	0,40	0,20
0,70	0,46	0,24
0,80	0,53	0,27
0,90	0,62	0,28
1	0,70	0,30
1,20	0,88	0,32
> 1,20	> 0,88	0,32

Chapitre III

TENEUR EN INOSITOLS ET GLUCIDES

de diverses urines humaines et de différentes espèces animales

P. FLEURY et A. RECOULES (14) ont appliqué leur technique de dosage de l'inositol à diverses urines normales ou pathologiques d'origine humaine. Les résultats obtenus correspondent à une inosurie physiologique d'environ 150 à 200 mg par litre. Les urines glycosuriques renferment des quantités bien supérieures d'inositol.

Nous nous sommes proposé de doser les polyols cycliques (inositols isomères) dans un certain nombre d'échantillons d'urine d'origine humaine et de quelques animaux. Nous avons dosé parallèlement dans ces urines la teneur en glucides réducteurs, en appréciant l'action réductrice sur l'iodomercurate en milieu faiblement alcalin, selon la méthode mise au point par Baudouin et Lewin et en suivant le protocole opératoire décrit par P. FLEURY (5).

Mais cette méthode a été établie par ses auteurs pour l'étude de la glycémie, elle s'applique donc à un liquide biologique de pH constant.

Pour l'utiliser dans le cas de l'urine nous avons dû apporter quelques modifications à la méthode citée, les différents échantillons présentant des réactions très variables. Nous avons dû amener d'abord l'urine à un pH défini; en fait le volume utilisé pour le dosage, mesuré à la pipette, a été d'abord additionné de quelques gouttes d'acide nitrique jusqu'à l'obtention d'un pH d'environ 2. Après addition du réactif nitromercurique nous avons ramené le mélange à un pH : environ 6,5 par une solution de soude versée goutte à goutte. La suite des opérations est identique à celles décrites par P. FLEURY (5).

Les résultats obtenus ont été exprimés en g de glucose par litre.

En général, nous avons opéré sur 2 cm³ d'urine. Dans le cas des urines plus chargées en glucose (mouton commun) nous avons employé un cm³. Pour certaines urines très riches en sucres réducteurs (sanglier sauvage) nous avons dû en employer seulement 0,5 cm³ ou même 0,25 cm³.

Dans quelques cas nous avons déterminé le taux d'inositol en nous basant soit sur la proportion d'acide périodique réduit, soit sur la courbe représentant la libération d'anhydride carbonique au cours de l'oxydation périodique en fonction du temps.

Les chiffres obtenus par les deux méthodes sont du même ordre de grandeur. Le dosage de l'acide périodique réduit est moins sélectif et fournit, en général, des chiffres un peu plus élevés.

TABLEAU III

TENEUR EN SUCRES REDUCTEURS ET EN CYCLOHEXITOLS DE DIVERSES URINES

Origine de l'urine	Sucres réducteurs en g de glucose par litre	Inositols en g par litre	
		d'après la courbe de dégagement de CO ₂ par oxydation périodique.	d'après la quantité d'acide périodique réduit.
Homme	0,32	0,24	0,45
"	0,40	0,41	
Femme	0,25	0,17	
"	0,45	0,41	0,31
Enfant	0,18	0,25	
Cheval	0,47	0,18	
Boeuf	0,23	0,36	
Vache	1,57	0,26	
"	1,31	0,35	
Mouton commun ⁽¹⁾ (mélange)	2,00	1,20	
Bélier mérinos	1,44	0,55	0,60
Brebis mérinos (plein air)	0,80	0,28	0,32
Brebis mérinos (vide)	0,90	0,30	0,34
Brebis mérinos (pleine)	1,08	0,32	0,38
Agnelles mérinos	0,50	0,21	0,27
Porc mâle	1,36	0,20	0,45
" "	1,80	0,45	
Porc femelle	1,60	0,22	
Porc (mélange ♂ et ♀)	2,00	0,25	0,28
" " "	1,90	0,44	
Sanglier mâle (état sauvage)	14,00	6,20	6,50
Sanglier femelle (état sauvage)	7,80	2,95	3,33
Sanglier femelle (captivité)	1,30	0,45	0,50

(1) Tous les échantillons d'urines d'ovidés utilisés au cours de ce travail proviennent de la Bergerie Nationale de Rambouillet. Nous remercions vivement M. MORET, maître-berger, qui les a recueillis à notre intention.

La concordance très satisfaisante entre la réduction de l'acide périodique et la libération d'anhydride carbonique permet de considérer que les substances dosées sont presque exclusivement des inositols.

La technique de P. FLEURY et A. RECOULES paraît donc susceptible d'être appliquée au dosage des inositols dans les urines de diverses espèces.

Nous remarquons également qu'il existe un net parallélisme, entre les teneurs des urines en substances réductrices, d'une part, et en inositols d'autre part. Il semble donc possible de généraliser aux urines normales des espèces étudiées la corrélation entre l'élimination urinaire des sucres et l'inosurie observée par divers auteurs (6) sur les urines humaines pathologiques.

Il serait hasardeux de vouloir tirer des conclusions trop générales à partir de données provenant d'un nombre limité d'urines dans chaque espèce, il est cependant permis de constater que les teneurs en inositols des urines de boeuf, vache et de porc ne sont pas très différentes de celles des urines humaines. Le mélange d'urines de moutons communs renfermait une plus forte proportion d'inositols que celles des espèces précédentes mais les teneurs les plus élevées ont été observées sur deux urines de sangliers. Ces animaux furent tués dans une chasse en forêt d'Othe(1). Ils avaient vécu dans des bois renfermant de nombreux chênes une année où il y avait eu abondance de glands; ces fruits sont particulièrement riches en cyclitols: quercitol et scyllitol.

Il semble logique de relier à cette alimentation à base de glands la forte teneur en inositols des urines. Nous avons pu, en effet, analyser l'urine d'un sanglier élevé en captivité(2) qui recevait une alimentation à base de céréales analogue à celle des porcs élevés dans les fermes françaises; l'urine de ce sanglier captif renfermait un taux d'inositols très inférieur à celui de ses congénères en liberté; par contre ce taux était du même ordre de grandeur que celui de ses "cousins" les porcs domestiques soumis au même régime.

Il apparaît donc que, dans le cas du sanglier, la teneur en inositols de l'urine soit en relation avec son alimentation.

(1) Animaux abattus dans la chasse des Centaines, dirigée par le Dr. Noël Peron, médecin des Hôpitaux de Paris. Nous désirons le remercier pour l'aide très amicale qu'il voulut bien apporter à Mr J. COURTOIS pour collecter les échantillons que nous avons analysés.

(2) Animal élevé par Monsieur PASQUIER à ADAINVILLE (S-et-O); nous le remercions vivement de nous avoir remis la vessie pleine d'urine de l'animal lorsqu'il l'eut sacrifié.

Chapitre IV

ESSAI D'ISOLEMENT DES INOSITOLS URINAIRES

La technique de dosage des inositols urinaires mise au point par P. FLEURY et A. RECOULES n'indique pas l'isomère qui est oxydé. Lorsque nous avons appliqué cette méthode aux différents isomères de l'inositol, nous avons pu constater que nous obtenions pour tous ceux-ci une courbe identique.

Nous avons ainsi été amené à tenter d'isoler, puis de fractionner les cyclitols présents dans l'urine.

Au cours de recherches antérieures, P. FLEURY et A. RECOULES (14) (21) avaient pu isoler de l'urine humaine quelques cristaux d'un corps oxydable par l'acide periodique comme un inositol et donnant le test à l'acide rhodizonique des inositols (test de Scherer-Gallois). Ce corps avait un point de fusion supérieur à celui du méso-inositol et se rapprochant de celui du scyllitol. La faible quantité de produit obtenue n'avait pas permis d'en pousser plus avant l'identification. Nous avons repris ces essais et pu identifier en premier lieu le scyllitol aussi bien dans différentes urines humaines que dans un mélange d'urines de sangliers.

Technique d'isolement. - Nous avons utilisé le protocole opératoire établi par A. RECOULES (21), dérivé du procédé adopté par J. Needham au cours de ses recherches sur l'inositol et le scyllitol de 1923 à 1929 (18) (19) et mis au point par P. FLEURY et J. COURTOIS (7). Nous y avons introduit quelques modifications qui se sont révélées susceptibles d'améliorer le rendement.

Voici le principe de cette technique et les différentes phases des opérations :

- a) - Entrainement des polyols par les sels de plomb et de cadmium (les glucides se trouvent entraînés en même temps).
- b) - Les polyols et les glucides sont libérés des hydroxydes de plomb et de cadmium par l'hydrogène sulfuré.
- c) - Après élimination du précipité du sulfure, la solution est déféquée par les sels mercuriques pour éliminer les composés azotés.
- d) - Les sucres réducteurs sont éliminés par destruction magnésienne.
- e) - Elimination des ions Mg^{++}
- f) - L'ion Cl est éliminé par l'acétate d'argent.

- g) - Les acides organiques sont entraînés par l'éther.
- h) - Le liquide extractif obtenu est évaporé et desséché.
- i) - L'extract sec est épuisé par l'alcool bouillant à différents titres.
- j) - Les solutions alcooliques laissent déposer, après refroidissement, des cristaux qui sont recueillis.
- k) - Les cristaux impurs, obtenus par évaporation des solutions alcooliques, sont soumis à la sublimation fractionnée dans le vide.

Application de cette méthode à des urines de sangliers et à des urines humaines.

1°- Urine de sanglier : Nous avons commencé nos essais sur une urine de sanglier; celle-ci s'étant révélée la plus concentrée en cyclohexitol, nous avons pensé avoir ainsi plus de facilité pour l'extraction et l'isolement des polyols.

Nous avons opéré sur un mélange des urines de sangliers sauvages, dont nous avons déjà indiqué la teneur en glucides et inositols, Tableau III.

L'opération a porté sur un volume de 1.000 cm³. Le dosage des inositols de ce mélange nous a donné une teneur de 4,56 g par litre, et le dosage des glucides réducteurs, par la méthode de Baudouin et Lewin: 11 gr 08 (exprimés en glucose). Il a fallu opérer sur 0,23 cm³ d'urine pour ce dernier dosage.

Défécation, en milieu acide, par le réactif de Courtonne.

L'urine a été amenée à une acidité voisine de pH 2,5 par addition de 20 cm³ d'acide chlorhydrique. Nous avons versé alors par petites quantités, et en agitant à chaque fois, 120 cm³ de réactif de Courtonne (solution d'acétate neutre de Plomb à 30 g pour 100 cm³) mais le liquide clair décanté précipite encore très fortement par ce réactif.

Par additions et essais successifs, nous avons obtenu un liquide décanté ne donnant plus de précipité par une nouvelle addition de réactif de Courtonne dont nous avons employé au total 290 cm³.

L'urine ainsi traitée a été abandonnée 24 heures au repos, à la température du laboratoire, puis filtrée sur Buchner.

Entraînement des Polyols.

Nous avons obtenu : 1.275 cm³ de liquide jaune, limpide de pH:4. Nous avons dissous dans ce liquide, par additions successives, et en agitant bien chaque fois :

30 g de nitrate de cadmium,

puis en agitant toujours, et par petites fractions :

63 cm³ de sous-acétate de plomb.

Le liquide se trouble d'abord puis s'éclaircit par agitations.

Nous avons prélevé 10 cm³ de ce liquide dans un tube à centrifuger. A l'aide d'une burette de Mohr nous avons laissé tomber de l'ammoniaque. A chaque addition nous agitions, ce qui donne un précipité abondant, puis nous centrifugeons.

L'opération est renouvelée jusqu'à ce que l'addition d'ammoniaque ne donne plus de précipité avec le liquide clair.

Nous avons employé 0,5 cm³ d'ammoniaque pour 10 cm³ de liquide.

Pour nos 1.275 cm³ de liquide, il nous faudra 60 cm³ d'ammoniaque auxquels nous ajouterons 6 cm³. (Nous avons constaté dans un essai préliminaire qu'une augmentation de 10 pour cent de la quantité d'ammoniaque améliorerait l'entraînement de l'inositol(1).

-
- (1)-Nous avons étudié un mélange d'urines humaines d'un volume de 12 litres
- Un dosage des inositols dans ce mélange effectué par oxydation périodique d'après le dégagement de CO₂ dans l'appareil de Warburg, nous a donné 400 mg par litre.
 - La totalité de l'urine a été amenée à pH environ 2,5 par 80 cm³ d'acide chlorhydrique pur, puis déféquée par addition de 1.250 cm³ de réactif de Courtonne.
 - Après repos, décantation et filtration nous avons dissous dans le liquide clair, par additions successives et agitations :
 - 240 g de nitrate de cadmium
 - et 600 cm³ de sous-acétate de plomb.
 - Le liquide (12.000 cm³) a été divisé en trois parties égales :
 - Dans la première fraction nous avons ajouté la quantité d'ammoniaque strictement nécessaire pour précipiter les hydroxydes de plomb et de cadmium, soit 108 cm³.
 - Dans la deuxième fraction, nous avons ajouté cette même quantité augmentée de 10 %., soit 118 cm³ environ.
 - Dans la troisième fraction, nous avons ajouté 108 cm³ + 20 %., soit : 130 cm³ d'ammoniaque.
 - Après avoir libéré, dans chaque portion, les polyols par traitement à l'acide sulfhydrique puis filtration, nous les avons dosés, toujours par oxydation périodique, dans l'appareil de Warburg, ce qui nous a donné le résultat suivant :
 - La deuxième fraction contenait 1 g, soit : 60 %.
 - La troisième fraction contenait 900 mg, soit : 56 %..
 - Il apparait donc que le meilleur rendement est obtenu par la quantité d'ammoniaque nécessaire pour précipiter totalement les hydroxydes métalliques augmentée de 10 %..

Après avoir bien mélangé, nous avons laissé 24 heures au repos au laboratoire, puis filtré sur Buchner. Le précipité, rincé à l'eau distillée et bien essoré, pèse 280 g.

Libération des polyols par l'hydrogène sulfuré.

Ce précipité a été délayé avec 360 cm³ d'eau distillée dans un ballon de deux litres placé sur un agitateur mécanique. Nous y avons fait passer un courant d'hydrogène sulfuré pendant 5 heures, sans interrompre l'agitation. Le liquide clair décanté ne précipitant plus par l'hydrogène sulfuré, nous avons laissé reposer, puis nous avons filtré sur Buchner. En fin d'opération le précipité de sulfure a été rincé avec environ 100 cm³ d'eau bouillante. Nous avons ainsi obtenu 430 cm³ de liquide qui a été porté à l'ébullition 15 minutes environ, pour le débarrasser de l'hydrogène sulfuré.

Ce liquide a une réaction acide (pH 3,0).

Le dosage des inositols nous donne 2,60 g pour la totalité (soit environ 60 pour cent des inositols déterminés initialement dans l'urine), et 6,20 g de glucides réducteurs (exprimés en glucose).

Nous avons titré l'acidité avec une solution N/10 de soude en présence de phénol-phtaléine, afin de calculer la quantité de baryte nécessaire pour revenir à la neutralité. Pour un cm³ de liquide il nous a fallu 2,5 cm³ de soude N/10.

Pour la totalité du liquide nous avons employé :

$$\frac{158 \times 0,25 \times 430}{1.000} = 17 \text{ g de Baryte}$$

Après neutralisation, nous avons filtré puis évaporé le liquide au bain-marie, sous courant d'air. Nous avons obtenu alors : 200 cm³ de liquide pH : 6,5 et contenant 2,24 g d'inositol.

Défécation mercurielle en vue de l'élimination des composés azotés.

Nous avons alors ajouté 100 cm³ de réactif au sulfate mercurique⁽¹⁾, laissé déposer, puis filtré sur Buchner. Le liquide a été neutralisé par addition de baryte en solution concentrée dans l'eau bouillante, jusqu'à une acidité voisine de pH: 5,5.

(1) Réactif au sulfate mercurique.

Oxyde jaune de mercure.....	200 g
Acide sulfurique pur.....	175 cm ³
Eau q.s.p.	1 litre

On triture au pilon, dans un mortier, l'oxyde mercurique avec la moitié de l'eau; on ajoute peu à peu en remuant au pilon la totalité de l'acide sulfurique pur. On ajoute enfin le reste de l'eau et on laisse décanter.

Après filtration, nous avons fait passer dans le liquide un courant d'hydrogène sulfuré pour précipiter le mercure, puis nous avons filtré à nouveau.

Le liquide a été alors porté sur un bain-marie bouillant et sous courant d'air; il a été réduit à 95 cm³.

Décoloration.

Notre liquide, à ce stade, est limpide mais très fortement coloré, (presque noir). Nous avons alors tenté une décoloration par le noir animal activé "Acticarbone".

Nous avons ajouté à notre liquide 5 g d'Acticarbone et 60 cm³ d'eau distillée. Après avoir bien délayé le noir nous avons laissé en contact 48 heures au laboratoire, puis agité deux heures à l'agitateur mécanique.

Après filtration, nous avons 150 cm³ d'un liquide limpide jaune foncé.

Cette opération a été nécessaire seulement pour l'urine de sanglier.

Nous n'avons pas eu besoin de l'appliquer aux urines humaines qui étaient entièrement décolorées après la première défécation.

Destruction des glucides par la magnésie.

Dans ce liquide nous avons dosé les glucides réducteurs et inositols. Nous avons trouvé, en totalité, 2,75 g de sucre réducteur (exprimés en glucose), que nous devons éliminer et 1,08 g d'inositol.

Le liquide a été additionné de 10 g de magnésie récemment calcinée à 800° environ, et maintenu 45 minutes au bain-marie bouillant dans un erlenmeyer surmonté d'un réfrigérant à reflux. Le contenu de l'erlenmeyer a pris la consistance d'un liquide épais, presque pâteux. Nous l'avons recueilli sur Buchner placé sur un erlenmeyer à tubulure latérale, relié à une trompe à vide, et filtré.

Le flacon a été rincé à l'eau bouillante et les eaux de rinçage versées sur le résidu resté sur le filtre. Nous avons terminé par un lessivage du résidu avec 23 cm³ environ, d'eau distillée bouillante. La partie insoluble restée sur le filtre est très colorée (brun foncé). Le liquide est limpide et jaune très clair. Il ne réduit plus la liqueur de Fehling et ne réduit que très faiblement le réactif de Nessler. Nous avons donc éliminé la presque totalité des glucides.

Elimination des ions Mg⁺⁺.

Nous introduisons le liquide dans un becher de 500 cm³ avec 3 g

de carbonate de baryum fraîchement préparé⁽¹⁾, et nous le portons à l'ébullition que nous maintenons très modérée.

Il s'est produit, au début, une forte effervescence qui a diminué peu à peu. Après 30 minutes d'ébullition nous avons filtré sur Buchner le contenu du Becher et rincé le résidu avec 15 cm³ environ, d'eau distillée bouillante.

Elimination des chlorures.

Nous avons éliminé les chlorures par l'acétate d'argent après les avoir dosés. Nous avons obtenu pour la totalité de notre liquide: 0,33 g (exprimé en Cl). La quantité nécessaire d'acétate d'argent est donc de 1,95 g d'après le calcul. Nous avons ajouté au liquide un léger excès, soit 2,30 g d'acétate d'argent pulvérulent. Le tout a été introduit avec des billes de verre dans un flacon bouché et soumis à l'agitation mécanique pendant 3 heures. Nous avons filtré sur Buchner.

Le filtrat, limpide, ne donne aucun précipité par addition d'une solution de nitrate d'argent. Nous avons donc éliminé la totalité des chlorures.

Le liquide contenant encore un peu d'acétate d'argent non combiné et des traces d'autres sels solubles d'argent, nous les avons éliminés par un courant d'hydrogène sulfuré. Ensuite nous avons filtré sur Buchner et éliminé l'hydrogène sulfuré en excès par l'ébullition puis, par un courant d'air comprimé.

Elimination des acides organiques.

Après concentration à un volume de 35 cm³, le liquide est acidifié par 2 cm³ d'acide sulfurique, et introduit dans un appareil à extraction continue pour liquide non miscibles (liquide extractif plus léger que l'eau).(2)

(1) Préparation du Carbonate de Baryum d'après A. Desjobert (2).

" Dans un tube à centrifuger à fond rond de 40 à 50 cm³, dissoudre
" le carbonate de soude préalablement titré acidimétriquement et
" exactement pesé dans 10 cm³ d'eau distillée (mettre au plus 1 g
" de CO₃Na₂ par tube à centrifuger). A cette solution, ajouter une
" solution de chlorure de baryum (5 p.100 en excès) dans 10 cm³
" d'eau distillée. Centrifuger. Remettre en suspension dans 20 cm³
" d'eau distillée et recommencer l'opération jusqu'à ce que la li-
" queur décantée, après centrifugation, ne se trouble plus par addi-
" tion d'une solution de NO₃Ag. Remettre alors le carbonate de baryum
" soigneusement en suspension dans 5 cm³ d'eau distillée".

(2) Appareil de Normand et Fayolle.

Dans un ballon de l'appareil nous avons mis 10 cm³ de solution N/1 de soude environ 100 cm³ d'éther.

L'appareil placé sur un bain-marie électrique a été maintenu 8 heures consécutives en fonctionnement.

Après arrêt et refroidissement il restait dans le ballon une quantité de soude correspondant à 8 cm³ de solution N/1. Il avait donc été absorbé 2 cm³ de soude N/1 par les acides organiques extraits.

Le liquide ainsi traité a été recueilli puis porté à l'ébullition sur bain-marie électrique pour chasser l'éther dissous et surnageant. Il a été ensuite neutralité exactement par la baryte pour le débarrasser de l'acide sulfurique, puis filtré sur Buchner et le précipité a été rincé à l'eau distillée. Nous avons alors un volume de 120 cm³ de liquide dans lequel un nouveau dosage de l'inositol nous indique un total de 261 mg.

Ce faible rendement (environ 1/20 des inositols trouvés dans l'urine initiale) est probablement dû à une adsorption au cours des traitements successifs exigeant des précipitations : élimination de l'acide sulfurique par la baryte, traitements par la magnésie, et par le carbonate de baryum, puisque c'est à ce stade que nous observons la perte la plus importante.

Evaporation du liquide extractif et dessiccation de l'extrait.

Le liquide final a été évaporé à sec et l'extrait obtenu, d'un poids de 3 g conservé sous vide en présence d'acide sulfurique.

Cet extrait se présente sous forme d'une masse brun clair de consistance résineuse, assez ferme, mais très hygroscopique, malgré l'élimination des sels de magnésium. Il renferme d'après le dernier dosage 6 pour cent des inositols contenus dans l'urine initiale.

Epuisement de l'extrait par l'alcool.

Nous avons traité cet extrait par des solutions alcooliques de titres décroissants :

1ère Fraction : L'extrait délayé dans 50 cm³ d'alcool à 95° a été placé dans un erlenmeyer surmonté d'un réfrigérant à reflux et maintenu deux heures au bain-marie bouillant. Au bout de ce temps, nous avons retiré l'Erlenmeyer, laissé déposer l'extrait et décanté le liquide alcoolique presque bouillant que nous avons transvasé dans un bécher.

Le liquide alcoolique est limpide. En refroidissant il se trouble progressivement. Nous l'avons laissé reposer 15 minutes. Pendant ce temps il se dépose un précipité amorphe. Le liquide limpide a été décanté et abandonné 24 heures au repos à la température du laboratoire. Nous avons observé alors, au fond du bécher, de petits cristaux que nous avons recueillis et lavés à l'alcool à 95° froid. La totalité des cristaux pesait 26 mg après dessiccation.

2ème Fraction : L'épuisement du résidu, par l'alcool à 80°, en suivant la même technique que pour la première fraction, nous a fourni avec un très faible rendement, quelques cristaux apparemment identiques à ceux de la première fraction.

Le résidu, après le deuxième épuisement, ne réduit pas l'acide périodique et ne libère pas d'anhydride carbonique par contact avec l'acide périodique à une température de 30°.

Etude des cristaux recueillis.

Les cristaux ont été photographiés sous microscope (fig.1A). Certains ont donné une image très nette nous permettant de les classer dans le système clinorhombique. Sur la figure obtenue, nous avons pu facilement en mesurer l'angle β et nous avons trouvé 117°. H. MULLER (17) indique pour les cristaux de scyllitol un angle β de 117° 12'.

Le point de fusion pris au bloc Maquenne a été pour les cristaux obtenus dans les deux fractions de 312°C.

Une prise d'essai environ 0,10 mg de ces cristaux a donné une réaction de Scherer-Gallois très intense, en utilisant le protocole opératoire de Mme Y. Fievet-Guinard (3).

"A une prise d'essai représentant 0,10 mg environ d'inositol ajouter une goutte d'une dilution au dixième de réactif mercurique de Meillère(1) évaporer à sec au bain-marie, au voisinage de 80°.

"Après dessiccation, laisser un quart d'heure sur le bain-marie Si la réaction est positive, le résidu présente une teinte corail avec de nombreux boursoufflements. Ajouter une goutte d'une solution d'acétate de baryum à 10 pour cent et évaporer à sec. Il se produit alors une coloration rose éosine. En ajoutant sur le résidu 0,3 cm³ à 0,5 cm³ d'acide acétique cristallisable et en évaporant à sec, et en recommençant ce traitement deux ou trois fois, la coloration s'intensifie très nettement.

"Dans ces conditions, la limite de sensibilité est voisine d'un centième de mg".

Action de l'acide périodique.

Après contact de 24 heures à la température du laboratoire, avec une solution sulfurique de periodate de sodium, 1,5 mg de cristaux réduisent 5 cm³ d'acide périodique N/50.

Cette consommation est identique à celle d'un échantillon témoin de méso-inositol étudié parallèlement (environ six molécules d'acide périodique consommées par molécule de corps).

(1) Réactif mercurique de Meillère :

Oxyde jaune de mercure.....	10 g
Acide nitrique.....	10 g
Eau distillée q.s.p.	200 cm ³

FIGURE I



A - Cristaux de scyllitol extraits
d'une urine de sanglier.



B - Cristaux de scyllitol extraits
d'une urine humaine.

Un mg de cristaux soumis à l'action de l'acide periodique à une température de 30° dans l'appareil de Warburg a donné une courbe de libération de CD₂ en fonction du temps strictement identique à la courbe obtenue avec un mg de méso-inositol.

Etude de l'action des cristaux sur la croissance du Neurospora Crassa "Inositolless".

Nous avons réalisé avec les cristaux recueillis, (que nous appellerons (S) la méthode d'essai microbiologique décrite page 13.

Dans une série de six flacons contenant chacun 20 cm³ de liquide de culture, nous avons ajouté : 0 γ, 50 γ, 75 γ, 100 γ, 200 γ et 500 γ de cristaux S.

Dans une autre série, nous avons ajouté du mésoinositol en observant la même répartition que pour S, mais en nous arrêtant à 200 γ.

Une troisième série a été faite avec des cristaux S plus un même poids de mésoinositol.

Enfin, une dernière série de 0 à 500 γ avec des cristaux de scyllitol pur.

Tous les flacons ont étéensemencés avec un cm³ de suspension de spores de Neurospora Crassa et placés à l'obscurité à une température voisine de 27°.

Après trois jours, les thalles produits dans chaque flacon ont été recueillis, séchés et pesés selon la technique déjà exposée. Nous avons réuni dans le tableau IV les résultats obtenus.

Nous voyons d'après ces chiffres, que les cristaux S, comme le scyllitol, n'ont manifesté aucune action favorable sur la croissance du Neurospora Crassa. Ils ne paraissent donc pas contenir de méso inositol.

Nous pouvons constater également qu'ils n'ont pas d'action inhibitrice sur le développement du Neurospora en présence d'inositol.

La forme de ces cristaux et les résultats donnés par les différents essais auxquels nous les avons soumis permettent d'envisager la présence de scyllitol.

Purification des cristaux S et nouvel essai au bloc Maquenne.

Ce qui restait des cristaux S fut purifié par sublimation dans le vide. Nous avons employé pour cette opération un appareil(1) dont voici la description sommaire et le schéma (Fig. II).

(1) Nous exprimons tous nos remerciements au Professeur M.M. JANOT et à son collaborateur le Dr R. GOUTAREL qui ont mis à notre disposition leur installation de sublimation dans le vide et qui nous ont initié à son utilisation.

Tableau N° IV

Action des cristaux S et H sur la croissance du Neurospora Crassa, cultivé en milieu synthétique, comparée à l'action du mésoinositol et à celle du scyllitol.

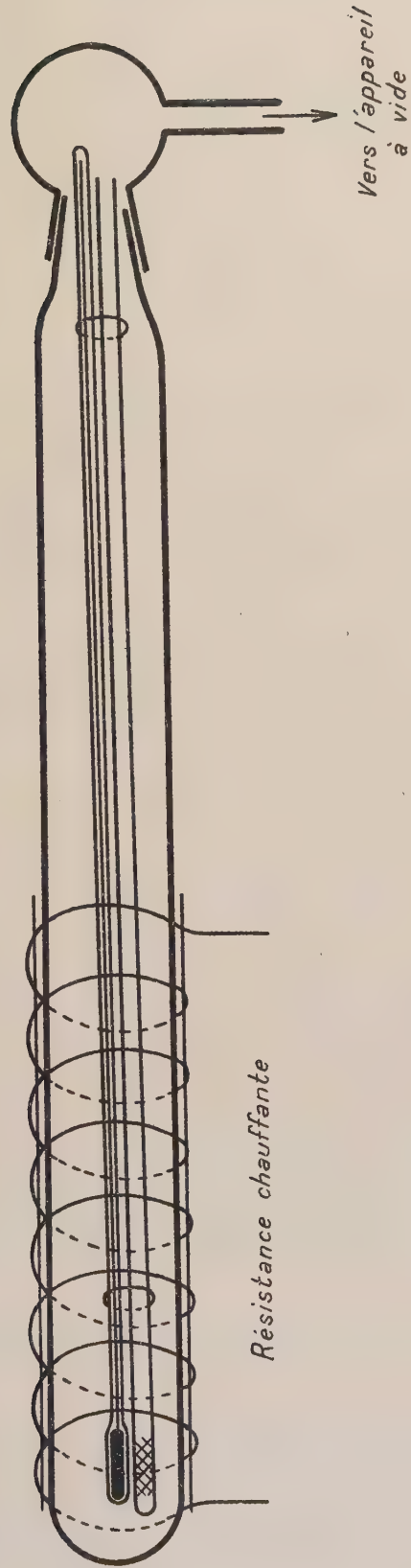
Poids en mg de thalle de Neurospora recueilli :

N° des flacons dans chaque série	Dose du corps essayé ajouté au milieu (en γ)	Corps essayé					
		Méso- inositol	Cristaux S	Cristaux S + mésoinositol(1)	Cristaux H	Cristaux H + mésoinositol(1)	Scyllitol
1	0	10	9	11	11	9	10
2	50	43	10	44	8	41	10
3	75	55	11	56	12	53	9
4	100	48	10	45	10	44	11
5	200	46	10	44		44	10
6	500		10		11		10

(1) Dans les flacons contenant le mélange m-inositol + S (ou m-inositol + H) nous avons mis pour chacun des 2 corps le poids indiqué dans la 2° colonne c.à c. (par exemple) que le flacon n° 2 de la série m-inositol + S contient 50 γ de m-inositol + 50 γ de cristaux S.

Fig. II

Appareil à sublimation dans le vide.



Le produit à essayer (quelques centigrammes) est introduit à l'extrémité fermée du tube "a" de 6 mm de diamètre, environ, et d'une longueur de 30 cm, environ. Ce tube est placé en même temps qu'un thermomètre dans une enceinte formée par un gros tube de verre "b" de 25 mm de diamètre fermé à une extrémité. L'ouverture de ce gros tube est rodée extérieurement de façon à recevoir une cloche en verre "c" rodée intérieurement et s'ajustant exactement sur ce tube. Cette cloche est munie d'une tubulure latérale reliée à un appareil permettant d'obtenir un vide très poussé de l'ordre de un centième de mm de mercure.

Le gros tube est entouré, de son extrémité fermée jusqu'à son milieu, par un fil résistant dans lequel on fait passer un courant électrique par l'intermédiaire d'un rhéostat réglable permettant d'obtenir la température désirée.

Après avoir fait le vide dans l'appareil on établit le courant et à l'aide du rhéostat et on fait monter la température très progressivement jusqu'à ce que l'on observe un dépôt cristallin sur la partie du tube a se trouvant à la sortie de la zone chauffante. On maintient alors la température environ une heure. On augmente ensuite cette température très lentement. Si le produit traité contient des corps différents, il se forme des anneaux successifs le long de la paroi interne du tube.

Au bout de quatre ou cinq heures, on peut arrêter le fonctionnement de l'appareil. On retire le tube dans lequel on a effectué la sublimation et on le sectionne à la limite de chaque anneau de cristallisation.

Nous avons traité, de cette façon, le reste de nos cristaux S.

Après les avoir introduits au fond du tube a et mis l'appareil en marche, nous avons atteint la température de 185° sans observer de dépôt cristallin dans la partie froide. Nous avons alors amené la température à 190°. Il s'est formé un anneau d'épaisseur très minime à une distance d'environ 3 cm de la zone chauffante. Nous avons maintenu cette température une heure, puis nous l'avons augmentée jusqu'à 200°. Nous avons pu observer alors l'augmentation du dépôt cristallin, mais pas la formation d'autres anneaux. Au fond du tube à distillation restait un résidu noirâtre. A ce moment, nous avons arrêté le chauffage et débranché l'appareil à vide. Après refroidissement, nous avons sectionné le tube à chaque extrémité de la zone du dépôt cristallin. L'anneau obtenu mesurait 15 mm de long. Nous avons détaché par grattage la plus grande partie du produit de sublimation se présentant sous la forme d'une masse compacte de cristaux très brillants et très blancs.

Une partie de ces cristaux a été essayée au bloc Maquenne et nous a donné un point de fusion de 349°.

Un mélange de ces derniers cristaux avec du scyllitol pur a donné un point de fusion de 348°.

Les résultats obtenus par tous ces essais sont bien concordants et l'inositol que nous avons isolé à l'état cristallisé, de l'urine de sanglier peut donc être identifié avec certitude au scyllitol.

La présence de scyllitol dans l'urine de sanglier nourri de glands n'est pas surprenante a priori, ces fruits étant très riches en quercitol et scyllitol.

Evaporation des liquides alcooliques d'extraction,
essais effectués sur le résidu obtenu.

La solution alcoolique ayant laissé déposer les cristaux que nous avons identifiés au scyllitol a été évaporée à sec. Nous avons obtenu un extrait d'aspect résineux pesant 0,52 g et contenant de très nombreux petits cristaux (mais il nous a été impossible d'isoler ces cristaux).

Une partie de ce résidu a été mise en solution dans l'eau distillée (à 1/200). Nous avons soumis à l'action de l'acide périodique dans l'appareil de Warburg 1 cm³ de cette solution en même temps que 1 cm³ de solution M/200 de m-inositol pur (contenant par conséquent 0,9 mg de m-inositol).

Nous avons noté toutes les heures les dénivellations en mm observées pour chaque manomètre.

Après 4 heures de marche de l'appareil, nous avons tracé les courbes pour chaque corps étudié (Courbe III).

Nous avons constaté que la courbe donnée par l'extrait essayé présente la même allure que la courbe obtenue avec le méso-inositol. La comparaison des pressions de CO₂ après 4 heures nous permet d'évaluer la teneur en inositol de l'extrait urinaire.

5 mg d'extrait donnent une dénivellation de 64 mm.

alors que :

0,9 mg de m-inositol donnent une dénivellation de 41 mm.

5 mmg d'extrait contiennent donc : $\frac{0,9 \times 64}{41} = 1,44 \text{ mmg}$

Nous avons ensuite procédé avec des doses croissantes de notre produit à des essais sur le développement du Neurospora selon le protocole opératoire déjà exposé en comparant les résultats obtenus avec ceux que nous ont donnés dans les mêmes conditions les doses croissantes de méso-inositol.

Ces résultats exprimés en mg de thalle ont été réunis dans le tableau N° V.

Nous remarquons :

1°- que l'extrait étudié stimule la croissance du Neurospora Crassa.

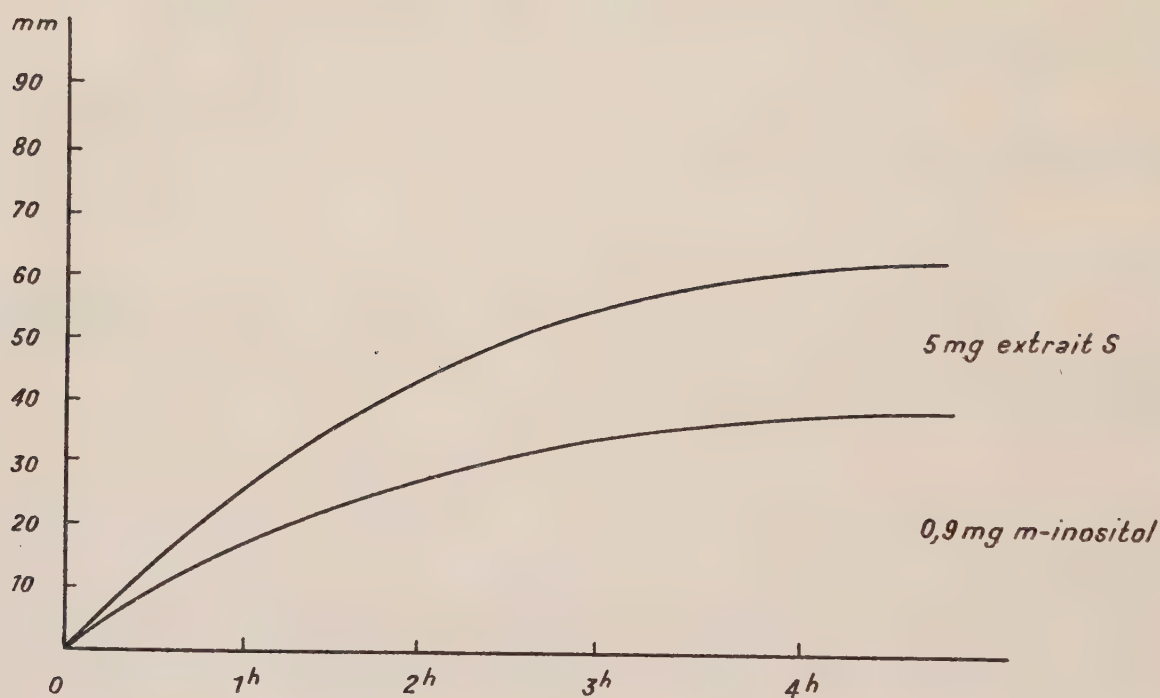
La dose optima de m-inositol produisant le maximum d'accroissement du Neurospora est de 75 γ pour 20 cm³ de milieu de culture. La dose

COURBE III

DENIVELLATIONS (EN MM), EN FONCTION DU TEMPS, OBSERVEES A
L'APPAREIL DE WARBURG, à 29°, PAR OXYDATION PERIODIQUE :

1°- d'une solution contenant 0,9 mg d'inositol

2°- d'une solution contenant 5 mg d'extrait S.



d'extrait optima employée dans les mêmes conditions que le m-inositol est de 1.000 γ .

Nous obtenons cependant avec l'extrait un accroissement plus faible que celui que nous donne le m-inositol, mais il est possible que l'extrait contienne des substances inhibitrices.

Si nous supposons que l'action de l'extrait sur la croissance du Neurospora est due au m-inositol, nous pouvons considérer que 1.000 γ d'extrait (dose optima) contiennent, environ, 75 γ de m-inositol.

D'après le dosage au Warburg 52.000 γ d'extrait contenaient 1.400 γ de cyclitols.

Nous pouvons penser que ces 1.400 γ de cyclitols sont composés de : 1.225 γ de scyllitols inactifs sur la croissance du Neurospora, et 275 γ de m-inositol.

Mais ceci n'est qu'une hypothèse et il nous faudra tenter d'identifier d'une façon plus précise le cyclohexitol actif sur le Neurospora, que nous venons de déceler dans notre extrait.

2°- Urines Humaines.

Toutes les opérations d'extraction que nous avons décrites, pour le traitement d'une urine de sanglier ont été pratiquées sur un mélange de quatre litres d'urines humaines. Seule la décoloration au noir "acticarbone" n'a pas été nécessaire, les urines humaines étant entièrement décolorées après la défécation plombique.

Nous avons obtenu un extrait d'un poids de 0,92 g présentant le même aspect que celui que nous avons obtenu à partir de l'urine de sanglier, mais beaucoup moins coloré. Celui-ci a été épuisé successivement deux heures par 50 cm³ d'alcool à 90°, puis deux heures par 50 cm³ d'alcool à 80° dans un Erlenmeyer surmonté d'un réfrigérant à reflux et placé sur un bain-marie bouillant. Après épuisement les solutions alcooliques ont été transvasées dans des béchers. Par refroidissement le liquide se trouble pour s'éclaircir ensuite par sédimentation. Nous avons décanté les solutions limpides que nous avons abandonnées jusqu'au lendemain à la température du laboratoire.

Après l'épuisement par l'alcool à 80°, le résidu, comme nous l'avons observé avec l'urine de sanglier, ne réduit pas l'acide periodique et ne libère pas l'anhydride carbonique par contact avec l'acide periodique à 30°C. Nous en avons donc extrait tous les cyclohexitols.

Après 24 heures nous avons pu recueillir dans nos deux béchers des cristaux d'une pureté satisfaisante que nous avons lavés à l'alcool à 90° et séchés à l'étuve à 100°. Nous avons ainsi récolté un poids total de 15 mg de cristaux que nous appellerons H.

TABLEAU V

Action des Extraits S et H sur la croissance du
"Neurospora Crassa" cultivé en milieu synthétique.

Poids de thalle récolté (en mmg).

Dose du corps essayé en γ	Corps essayé		
	Mésoinositol	Extrait Alcoolique S	Extrait Alcoolique H
0	5	6	5
50	39		
75	50		
100	46	10	
200		13	23
1000		35	40
2000		32	30

Essai des Cristaux H.

En utilisant le protocole opératoire de Mme Y. FIEVET-GUINARD nous avons observé une réaction de Scherer-Gallois très intense avec, environ, 0,1 mg de cristaux.

- Le point de fusion pris au bloc Maquenne était de 309-310°.

- Une microphotographie des cristaux H (Fig. I B) nous a permis de les classer dans le système clinorhombique, mais nous n'avons pas pu obtenir une image assez nette pour mesurer l'angle β .

- Action de l'acide periodique: une prise d'essai de 1,5 mg de cristaux H a réduit 5 cm³ de solution N/50 d'acide periodique après un contact de 24 heures à la température du laboratoire, action identique à celle que nous avons observée avec un échantillon témoin de m-inositol.

- La courbe de libération de CO₂, en fonction du temps, par oxydation periodique a été semblable à celle que nous avons obtenue avec un même poids de m-inositol pur.

- Etude de l'action des cristaux H sur la croissance du Neurospor Crassa :

L'essai des cristaux H a été effectué parallèlement à l'essai des cristaux S. Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau V.

Purification par sublimation dans le vide :

8 mg environ de cristaux ont été purifiés par sublimation sous vide. Les cristaux recueillis ont été détachés du tube et essayés au bloc Maquenne. Nous avons observé un point de fusion de 347°. Un mélange avec du scyllitol pur nous a donné un point de fusion de 347° également.

Il semble donc que les cristaux H extraits des urines humaines sont identiques aux cristaux S extraits des urines de sangliers.

Toutes les réactions auxquelles nous les avons soumis les identifient au scyllitol.

Etude du liquide alcoolique d'extraction :

Après évaporation des solutions alcooliques et dessiccation de l'extrait, celui-ci a été soumis aux mêmes essais que l'extrait alcoolique des urines de sanglier.

Par action de l'acide periodique dans l'appareil de Warburg, nous avons obtenu une courbe de libération de CO₂ en fonction du temps identique à celle d'un inositol.

Cet essai nous indique en même temps une teneur en cyclitol de 82 mg.

Etude du produit obtenu sur le développement du Neurospora-Crassa en milieu synthétique :

En opérant comme pour l'urine de sanglier, nous avons obtenu les résultats rassemblés dans le tableau N° V.

Nous retrouvons dans les solutions alcooliques d'extraction des urines humaines les mêmes propriétés que nous avons observées avec les urines de sanglier. Ce qui montre que dans les urines humaines se trouve, à côté du scyllitol identifié, au moins un autre inositol ayant une action favorisante sur la croissance du Neurospora-Crassa, et comparable à l'action du méso-inositol.

CHAPITRE V

NOUVELLES TENTATIVES DE FRACTIONNEMENT AVEC L'URINE HUMAINE.

Nous sommes partis de 5 litres d'un mélange d'urines humaines.

Le dosage des inositols dans ce mélange a donné :
290 mg par litre.

Après les diverses opérations d'extraction et de purification selon les techniques décrites et déjà utilisées, nous avons obtenu 2,80 g d'un extrait présentant l'aspect d'une masse cristalline enrobée dans une substance d'aspect résineux. Le dosage des inositols dans cet extrait nous donne un total de 120 mg, alors que nous étions partis de 1.450 mg.

Sur cet extrait, nous avons voulu tenter encore un isolement des inositols à l'état cristallisé par l'alcool à différents titres.

Nous avons alors procédé avec des alcools de titres décroissants à des épuisements au bain-marie bouillant pendant deux heures et demie dans un Erlenmeyer surmonté d'un réfrigérant à reflux.

Chaque portion de liquide alcoolique résultant des différentes extractions a été titré en inositol.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- L'extrait ayant été épuisé par 40 cm³ d'alcool à 100° le liquide alcoolique décanté contenait au total 18,90 mg de cyclohexitol.

- L'alcool à 90° employé dans les mêmes conditions a donné un liquide extractif contenant 91 mg de cyclohexitol.

- Nous avons trouvé avec l'alcool à 80° : 5,90 mg de cyclohexitol.

- Et avec l'alcool à 70° : 0,50 mg de cyclohexitol.

- L'alcool à 60° employé finalement ne contenait pas de cyclohexitol.

- Nous nous sommes assurés également, par l'action de l'acide périodique, que le résidu ne contenait plus de cyclohexitol.

Avec ces diverses solutions, nous avons tenté des cristallisations mais sans plus de succès que lors des premiers essais.

Nous avons isolé quelques cristaux déposés sur les parois des becher après un repos de 24 heures à la température du laboratoire. Ces cristaux (quelques mmg) présentaient les caractères du scyllitol :

réaction de Scherer-Gallois positive avec une fraction de mg, courbe de dégagement de CO₂ par oxydation périodique identique à celle d'un cyclohexitol mais aucune action sur la croissance du Neurospora-Crassa.

Il semble que la substance sirupeuse entraînée dans nos extractions alcooliques solubilise les polyols. De plus, elle rend très difficile la récolte des cristaux qui ont pu se former.

Les diverses solutions alcooliques ont été alors réunies et évaporées à sec. Nous avons obtenu une masse ressemblant à l'extrait initial mais moins colorée et moins hygroscopique, pesant 1,90 g.

Ce résidu a été introduit avec 20 cm³ d'alcool à 90° (puisque nous avons observé que l'alcool à 90° est le meilleur solvant des inositols dans les conditions où nous opérons) dans le fond d'un tube à essai de 30 cm courbé par chauffage de façon à obtenir deux branches égales. Nous avons scellé ensuite à la flamme l'ouverture du tube.

La branche contenant l'extrait et l'alcool est plongée pendant deux heures dans un bain-marie bouillant. Après l'avoir retirée, nous laissons décanter pendant quelques minutes et, par inclinaison, faisons écouler le liquide dans le second diverticule. Nous laissons cristalliser pendant douze heures environ à la température du laboratoire. Par inclinaison, en sens inverse l'alcool est remis en contact avec le résidu demeuré dans le fond du premier diverticule. Nous procédons à un nouvel épuisement dans les conditions précédentes. Après six épuisements successifs, nous coupons le tube au niveau de la courbure, ce qui nous a permis de recueillir 0,30 g d'une masse cristalline colorée en jaune et fortement adhérente à la paroi.

Nous détachons du tube la presque totalité de cette masse et l'introduisons dans le fond d'un tube étroit pour la soumettre à une sublimation sous une pression de 0,01 mm de mercure.

Par chauffage à 150-170°, il se forme un premier dépôt cristallin a assez éloigné de la masse chauffée.



FIGURE III

A 180° il se dépose une seconde couche de cristaux moins éloignée b.

Enfin à 200° il se dépose une troisième couche c à la limite de la zone chauffée, et très proche de la zone b.

Après avoir retiré le tube de l'appareil à distillation, nous l'avons sectionné à la limite des différentes zones de cristallisation et avons séparé ainsi les cristaux a b c. Nous avons pesé ces différentes sections avant et après avoir recueilli les cristaux. La plus grande partie a a été recueillie par grattage et ce qui restait, adhérent à la paroi du tube, par dissolution dans l'eau distillée.

Nous avons effectué sur chaque partie les essais suivants :

1°- Cristaux a : la réaction de Scherer-Gallois a donné un résultat négatif, même avec un mg.

Ils réduisent l'acide periodique, mais la courbe de dégagement de CO₂ est totalement différente de celle d'un inositol. Un essai sur la croissance du *Neurospora* a donné un résultat négatif. (Tableau VI).

2°- Nous avons recueilli 18 mg de cristaux b.

Ils fondent à 290° au bloc Maquenne.

Ils donnent une réaction de Scherer intense.

L'essai de leur action sur le développement du *Neurospora* nous a donné les résultats consignés dans le tableau N° VI.

3°- La fraction c pesait 26 mg. La température de fusion au bloc Maquenne était de 347°.

Une prise de 0,1 mg a donné un test de Scherer-Gallois très intense.

Nous n'avons observé aucun effet sur la croissance du *Neurospora*-Crassa (Tableau VI).

Nous pouvons donc conclure que la fraction a n'est pas un inositol et que la fraction c est constituée de scyllitol pratiquement pur, comme l'indique son point de fusion.

Il est plus difficile de fixer la composition de la fraction b. Est-elle constituée par un mélange d'une partie de mésoinositol pour neuf parties de scyllitol? - C'est ce que tiendrait à indiquer l'action sur le *Neurospora* et le point de fusion 290° intermédiaire entre ceux du mésoinositol : 220-224° et du scyllitol : 347°.

Il serait cependant prématuré de conclure aussi rapidement car le mésoinositol, s'il est le cyclohexitol le plus efficace sur la croissance du *Neurospora*, n'est cependant pas le seul actif. Schopfer, Posternak et Mlle Boss (24) ont montré que le l-inositol avait sur cette croissance une activité de 4,5 si l'on fixe arbitrairement à 100 l'action du mésoinositol.

Les cristaux b sont, d'une part, plus actifs sur le développement du *Neurospora* que le l-inositol et d'autre part, fondent à 290° alors que le l-inositol possède, d'après les données de la littérature(6) un point de fusion de 237-247° et, d'après un échantillon du laboratoire: F. 246-247°. Il apparaît donc difficile de considérer que les cristaux b sont constitués de l-Inositol.

Il est assez curieux de remarquer que ces cristaux b ont sensiblement le même point de fusion: 285-290° que ceux indiqués dans la littérature pour le muco-inositol et l'épiinositol.

A notre connaissance, ces deux inositols n'ont pas encore été testés avec le *Neurospora*.

TABLEAU VI

ACTION DES CRISTAUX a b et c SUR LA CROISSANCE

DU NEUROSPORA-CRASSA

Poids en mg de thalle récolté

Dose du Corps essayé (en γ)	Corps Essayé			
	Mésoinositol	Cristaux <u>a</u>	Cristaux <u>b</u>	Cristaux <u>c</u>
0	5	5		5
50	35			
75	48	6		
100	45		7	6
200	44	4,5		
500			15	7
750			45	
1000			43	6

Chapitre VI

SEPARATION ET CARACTERISATION DU MESOINOSITOL ET DU SCYLLITOL DANS LES URINES DE MAMMIFERES PAR L'EMPLOI DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

La méthode que nous avons utilisée pour l'extraction des cyclohexitols urinaires et que nous venons de décrire est longue et laborieuse. Les rendements auxquels elle conduit étant très faibles ont imposé de travailler sur des mélanges. On ne peut donc ni multiplier les essais, ni faire des statistiques sur des séries de sujets étudiés individuellement.

Les nombreuses opérations qu'elle nécessite peuvent faire craindre la perte d'une proportion importante des substances que l'on cherche à isoler et aussi une éventuelle isomérisation du ou des cyclohexitols naturels.

Nous avons cherché à confirmer et à étendre les investigations antérieures mais en usant de moyens entièrement différents.

Il a paru intéressant d'appliquer à nos recherches la technique mise au point par P. FLEURY, J. COURTOIS et P. MALANGEAU (9) pour l'identification chromatographique du mésoinositol et du scyllitol.

Principe de cette méthode : Le solvant utilisé est un mélange homogène. Les solvants qui se sont avérés les plus convenables sont des alcools ou des mélanges d'alcools (méthanol, éthanol). Ces alcools employés sans addition d'eau donnent un entraînement nul ou très faible des substances étudiées. Si on ajoute de l'eau l'entraînement est d'autant plus important que la proportion d'eau est plus élevée. Si l'on compare, avec de semblables solvants, le comportement du mésoinositol et du scyllitol, on observe les faits suivants : le mésoinositol soumis à l'action de l'éthanol absolu n'est pas déplacé. En opérant avec des alcools de titres régulièrement décroissants le déplacement du mésoinositol s'accroît régulièrement au fur et à mesure que le titre de l'alcool s'abaisse. Le scyllitol n'est également pas déplacé par l'éthanol absolu; mais lorsqu'on utilise des alcools de titres de plus en plus faibles, il reste sur la ligne de départ tant que l'alcool utilisé ne présente pas un titre suffisamment bas.

En opérant avec un alcool de titre assez élevé pour déplacer le mésoinositol, mais ne donnant pas de déplacement de scyllitol, on arrive à séparer ces deux isomères.

Le papier chromatographique est alors séché à l'étuve et les spots révélés. Les auteurs ont adapté à cet effet la réaction de Scherer-Gallois en utilisant le réactif indiqué par G. Meillère.

Oxyde mercurique.....	10 g.
Acide nitrique.....	10 g.
Eau distillée q.s.p.	200 cm ³

On pulvérise sur les taches à révéler le réactif de Meillère dilué à 1/3, et on place le papier pendant 10 minutes à une température comprise entre 85° et 100°. Ensuite on soumet le papier à une nouvelle pulvérisation on le remet à l'étuve à la même température pendant cinq minutes.

On pulvérise alors sur le papier le réactif suivant :

Acétate de baryum en solution aqueuse à 10 %/o	15 cm ³
Acide acétique pur q.s.p.	100 cm ³

Le papier est remplacé deux minutes à l'étuve, soumis à une nouvelle pulvérisation, remis à l'étuve deux minutes. On répète 4 ou 5 fois ces opérations.

On voit apparaître une coloration caractéristique rose saumon se manifestant à la première, deuxième, troisième, quatrième et cinquième pulvérisation selon la concentration en inositol de la solution mise en oeuvre.

Cette réaction extrêmement sensible permet de déceler des quantités d'inositols de 5 à 10 γ .

La réaction s'effectue mal en présence de chlorures. La coloration peut ne pas se produire au delà d'une certaine concentration en sels.

Cette méthode de séparation chromatographique des cyclohexitols est en ce moment appliquée pour la recherche systématique des deux isomères en question dans l'urine humaine par P. MALANCEAU qui a mis au point une méthode d'isolement basée sur l'emploi des résines échangeuses d'ions.

Nous avons, en liaison avec cet auteur, appliqué la même méthode à l'étude d'un certain nombre d'échantillons d'urines de Mammifères.

Principe de la méthode :

a) Obtention des extraits urinaires : L'urine à étudier est débarrassée de tous ses éléments ionisés par passage sur des colonnes d'échangeurs d'ions.

On fait d'abord passer l'urine sur une colonne chargée d'une résine à échange de cations (résine polystyrène sulfoné : permutite 50). Cette résine fixe les cations ainsi que les aminoacides et l'urée.

Le liquide effluent, convenablement concentré, est passé sur une colonne de résine à échange d'anions (déacidite 300).

Ces deux résines : permutite 500 et déacidite 300, proviennent de la firme Phillips et Pain.

Après ce traitement on obtient un liquide qui ne renferme plus d'éléments minéraux ni d'urée et qui contient les glucides ou les oses résultant de leur dédoublement, et les cyclohexitols.

b) Séparation chromatographique : Cette solution est soumise à la chromatographie sur papier en suivant la technique décrite.

Technique :

Préparation des colonnes de résines : Les colonnes sont constituées par des tubes en verre en forme d'allonges d'un diamètre intérieur de 35 mm et d'une hauteur utile de 50 cm. Les colonnes sont garnies dans leur partie inférieure d'un tampon de coton; elles sont remplies de résine qui a été calibrée par passage, d'abord sur un tamis N° 25, puis sur un tamis N° 50 de façon à éliminer les particules les plus grossières et les plus fines. On emploie, pour chaque colonne, environ 200 g de résine sèche qu'on a fait gonfler par contact avec de l'eau distillée, pendant 12 à 24 heures.

La colonne de permutite 50 est préparée de façon à fonctionner en cycle hydrogène. Par conséquent elle est soumise à l'action d'un acide fort. On fait passer sur la colonne un litre d'acide chlorhydrique à la concentration suivante :

Acide chlorhydrique officinal	200 cm ³
Eau distillée q.s.p.	1000 cm ³

Le débit du liquide sortant de la colonne doit être réglé de façon que le liquide s'écoule goutte à goutte (environ quinze gouttes par minute).

Il ne faut pas saturer la colonne; on lui fait donc subir un lavage avec 5 litres d'eau distillée passant à la même cadence.

La colonne de déacidite 300 est préparée de la même façon mais avec une solution alcaline de formule :

Lessive de soude officinale	125 cm ³
Eau distillée q.s.p.	1000 cm ³

On lave ensuite avec 10 litres d'eau distillée.

Utilisation des Colonnes :

Pour éviter que les colonnes se fissurent et perdent leur homogénéité, il est préférable de les conserver en présence d'une quantité d'eau suffisante.

Les colonnes de la capacité que nous venons d'indiquer permettent le traitement de 125 cm³ d'urine. On passe l'urine d'abord sur la permutite 50 et ensuite sur la déacidite 300. On peut aussi bien opérer dans le sens inverse. On laisse égoutter la colonne pour éliminer l'excédent d'eau. L'écoulement étant terminé, on ferme l'orifice inférieur et on introduit l'urine par l'orifice supérieur. On laisse en contact vingt minutes environ puis on ouvre l'orifice inférieur. On laisse écou-

ler jusqu'à ce qu'il ne reste plus de liquide surmontant la résine. On repasse le liquide que l'on vient de recueillir sur la colonne et on laisse à nouveau reposer vingt minutes. On laisse alors le liquide s'écouler à raison de dix à quinze gouttes à la minute puis on lave la colonne avec 250 cm³ d'eau distillée.

La liqueur recueillie est débarrassée des cations; elle est alors passée sur la colonne de déacidite 300 qui retiendra les anions, en opérant exactement de la même façon que pour le passage du liquide sur la colonne de permutite 50. On lave ensuite avec un volume d'eau distillée égal à deux fois le volume de la solution traitée. La liqueur finale est évaporée à sec d'abord au bain-marie puis sous vide en présence d'un absorbant.

Le résidu obtenu dans ces conditions à partir de 125 cm³ d'urine pèse environ 100 mg. rarement plus. Il contient en particulier les oses urinaires et les cyclohexitols.

Chromatographie des extraits :

Chaque extrait est repris par 0,5 cm³ d'eau distillée au bain-marie bouillant et la solution obtenue est soumise à la chromatographie - sur du papier ARCHES 1030 -

En un même point de la ligne de départ on dépose successivement trois très petites gouttes de solution de l'extrait essayé, le diamètre de la tache ainsi formée restant inférieur à 10 mm. En un autre point de la ligne de départ, on dépose une très petite goutte d'un mélange témoin de mésoinositol et de scyllitol.

Le solvant utilisé est un mélange homogène :

Alcool méthylique à 99°5	90
Eau distillée	10

Le papier est maintenu 24 heures dans une enceinte en verre pour chromatographie où est disposé un cristalloir garni d'une centaine de cm³ de solvant. Une fois ce laps de temps écoulé, on garni l'auget avec le solvant et laisse la course du solvant se poursuivre pendant 90 minutes.

Après séchage du papier, on détermine la position des cyclohexitols, selon la technique que nous avons antérieurement signalée, à l'aide d'une réaction de Scherer modifiée. L'emplacement des deux hexitols se signale par l'apparition de taches colorées en rose saumon.

Dans les conditions décrites, le mésoinositol est entraîné à 50 mm, environ, de la ligne de départ alors que le scyllitol ne se déplace pas et reste à son point de départ. Nous n'avons jamais jugé utile de procéder à un second développement du chromatogramme afin de faire quitter au scyllitol sa position initiale. Les colorations se développent très bien ainsi.

Nous avons traité des urines d'animaux supérieurs au nombre de 21, comprenant :

1 Jument
1 Vache adulte
2 Génisses
7 Brebis
3 Béliers
1 Agneau
1 Chèvre
3 Chevreuils (2 ♂ - 1 ♀)

Dans tous les cas la présence d'une tache correspondent à l'emplacement du mésoinositol a été observée.

Pour 8 des extraits urinaires étudiés, on voit une tache au niveau de la ligne de départ analogue à celle fournie par le scyllitol du mélange témoin. Les réponses sont extrêmement nettes et ne prêtent à aucune discussion.

Il s'agit des extraits suivants :

1 Jument
1 Génisse
4 Brebis (sur 7)
1 Bélier (sur 3)
1 Agneau

Bien que la preuve formelle de la coexistence dans l'urine de ces animaux des deux hexitols isomères ne puisse être administrée que par leur isolement et leur séparation, la lecture des chromatogrammes permet de considérer comme extrêmement probables les faits suivants :

1°- Le mesoinositol est normalement présent dans toutes les urines d'animaux supérieurs que nous avons examinées.

2°- Le scyllitol n'est pas constamment présent dans ces mêmes urines mais l'on y trouve avec une fréquence suffisante pour qu'on puisse le considérer comme un constituant normal.

Il convient de noter que P. MALANGEAU a obtenu, avec les urines humaines, des résultats du même ordre.

Nous n'avons jamais observé de taches se situant au delà de celles du mésoinositol ou entre celles-ci et celles du scyllitol et qui correspondraient à d'autres cyclohexitols.

Le nombre d'urines examinées est trop peu élevé pour qu'on puisse accorder au pourcentage observé des urines à scyllitol (38 %) un caractère général mais on peut probablement fixer un ordre de fréquence

Il est vraisemblable que plus de 25 % et moins de 50 % des urines contiennent du scyllitol.

Il apparait, pour l'instant du moins, qu'il n'est pas possible de grouper les animaux qui éliminent du scyllitol par les urines en fon-

tion de leur sexe ou de leur âge, pas plus que de leur place dans la classification zoologique. Aucune ébauche d'hypothèse ne se propose pour expliquer les faits que nous venons de rapporter et qu'il nous faut nous borner à constater. Tout au plus peut-on envisager l'hypothèse que la présence de scyllitol pourrait être en rapport avec la constitution de la ration alimentaire.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous nous sommes efforcé de rechercher, doser et caractériser les cyclohexanehexols (inositols) dans diverses urines de Mammifères.

Pour ce faire, nous avons eu recours aux techniques mises au point par A. RECOULES et permettant d'obtenir des fractions d'extrait urinaire débarrassées d'oses ou osides.

Les inositols furent dosés chimiquement à l'aide de l'acide periodique en déterminant la proportion d'acide periodique réduit et la vitesse de libération de l'anhydride carbonique qui prend naissance au cours des dernières étapes de l'oxydation periodique avec divers inositols : scyllitol, mésoinositol, d.inositol, l.inositol, d.l.inositol. Nous avons observé que pour des oxydations de longue durée à 30°, les courbes de libération de l'anhydride carbonique étaient pratiquement superposables.

La différenciation des inositols urinaires nous a amené à utiliser deux tests complémentaires :

a) l'action stimulante très sélective du mésoinositol sur le développement d'un mutant de Neurospora-Grassa.

b) la séparation des inositols par chromatographie sur papier; nous avons utilisé la méthode très sensible et sélective mise au point par P. MALANGEAU.

I - Dans un premier groupe d'essais nous avons pu déceler des inositols dans toutes les urines examinées : homme - femme - cheval - agneau - porc mâle ou femelle - sanglier vivant à l'état sauvage ou en captivité.

Il existe un net parallélisme entre les teneurs de ces urines en inositols et en sucres réducteurs évalués en glucose. Il apparaît donc possible de généraliser aux urines normales des espèces étudiées la corrélation entre l'élimination urinaire des sucres et l'inosurie observée par divers auteurs sur les urines humaines pathologiques.

Les teneurs en inositols des urines de boeuf, vache, porc ne sont pas très différentes de celles des urines humaines, 0,30 g. par litre en moyenne. Les urines des ovidés en renferment parfois des proportions plus élevées.

Les chiffres les plus élevés ont été fournis par des sangliers tués dans une forêt où les glands étaient abondants : 2,95 g. et 6,20 g. par litre pour les échantillons analysés. Les glands étant très riches en cyclitols, il paraît logique de relier l'excrétion urinaire d'inositol au régime alimentaire.

II - Nous avons tenté d'extraire les inositols présents dans un mélange d'urines humaines et dans une urine de sanglier.

Nous avons suivi la méthode d'isolement décrite par A.RECCULES à laquelle nous avons apporté quelques améliorations.

Les polyols sont entraînés par les hydroxydes de plomb et cadmium en milieu ammoniacal, libérés de ce précipité par l'hydrogène sulfuré, les composés azotés présents sont éliminés par défécation mercurielle, les sucres détruits par chauffage avec de la magnésie et leurs produits de transformation extraits en épuisant par l'éther en milieu acide.

L'extrait obtenu est traité par l'alcool chaud, il laisse déposer par refroidissement une petite quantité de cristaux. Ceux-ci furent purifiés par sublimation fractionnée dans le vide.

Les urines humaines, comme celles du sanglier, nous ont permis de séparer le même corps. Ce dernier réduit l'acide périodique selon les mêmes modalités que les inositols, il donne la réaction de Scherer-Gallois caractéristique des inositols.

Il demeure sans action sur le développement du Neurospora Crassa et n'entrave pas l'action stimulante sur la croissance que provoque le mésoinositol. Enfin la forme de cristaux et leur point de fusion complètent l'identification au scyllitol.

Les eaux-mères de cristallisation du scyllitol renferment une substance oxydable par l'acide périodique et favorisent la croissance du Neurospora. Cet inositol n'a pu être séparé par cristallisation ou sublimation du scyllitol associé.

III - La chromatographie sur papier nous a permis de constater que cette substance activant la croissance du Neurospora était effectivement le mésoinositol.

L'urine est traitée selon la méthode de Malangeau, les constituants ionisés de l'urine et l'urée sont éliminés par passage sur une colonne garnie d'un échangeur de cations, puis sur une seconde colonne renfermant un échangeur d'anions.

Le liquide résultant contient en particulier des oses associés aux cyclitols, il est soumis à une chromatographie sur papier avec le mélange homogène : méthanol-eau. La révélation est effectuée selon la réaction nitromercurique de Scherer-Gallois.

Avec des urines de jument, vache, génisse, brebis, bétail, agneau, chèvre, chevreuil, porc et chien, nous avons décelé chaque fois le spot caractéristique du mésoinositol.

Nous avons retrouvé avec 8 des urines sur les 21 étudiées le spot du scyllitol.

Ces urines ne paraissent pas renfermer d'autres inositols.

Le mésoinositol paraît donc être normalement présent dans les urines de Mammifères. Le scyllitol n'est pas constamment présent dans ces mêmes urines, il se retrouve cependant avec une fréquence suffisante pour qu'on puisse le considérer comme un constituant normal.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BEADLE (G.W.) - J. Biol. Chim., 1944, 156, 683-689.
- 2 - DESJOBERT (A.) - Thèse Doct. Sc. Phys., Paris 1951.
- 3 - FIEVET-GUINARD (Y.) (Mme) ⁴ Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1945.
- 4 - FLETCHER (H.G.), ANDERSON (L.) et LARDY (H.A.) - J. Org. Chem.
1951, 16, 1238.
- 5 - FLEURY (P.) - Fiches Techniques de Chim. Biol. - Vega.
- 6 - FLEURY (P.) et BALATRE (P.) - "Les Inositols" - Masson, 1947.
- 7 - FLEURY (P.) et COURTOIS (J.) - J. Pharm. Chim., 1932, 16, 97.
- 8 - FLEURY (P.), COURTOIS (J.) et BIEDER (A.) - Bull. Soc. Chim. France,
1953, 543.
- 9 - FLEURY (P.), COURTOIS (J.) et MALANGEAU (P.) - Bull. Soc. Chim. Biol.
1953, 35 (à l'impression).
- 10 - FLEURY (P.) et Mlle JOLY (M.) - J. Pharm. Chim., 1937, 26, 341.
- 11 - FLEURY (P.) et LANGE (J.) - J. Pharm. Chim., 1953, 17, 313.
- 12 - FLEURY (P.) et MARQUE (J.) - J. Pharm. Chim., 1929, 10, 241.
- 13 - FLEURY (P.), POIROT (G.) et Mme FIEVET (Y.) - C.R. Ac. Sc., 1945,
220, 664-666.
- 14 - FLEURY (P.) et RECOULES (A.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1949, 31, 256.
- 15 - JOLY (M.) Mlle - Thèse Doct. Univ. Pharm., Paris, 1936.
- 16 - LANGE (J.) - Thèse Doct. Univ. Pharm., Paris, 1936.
- 17 - MULLER (H.) - J. Chem. Soc. London, 1912, 101, 2383.
- 18 - NEEDHAM (J.) - Biochem. J., 1923, 17, 422.
- 19 - NEEDHAM (J.) - Biochem. J., 1929, 23, 319.
- 20 - POSTERNAK (Th.) - Helv. Chim. Acta., 1942, 25, 746.
- 21 - RECOULES (A.) - Thèse Doct. Pharm. Etat, Paris, 1948.
- 22 - SCHERER (J.) - Liebig's Ann. d. Chem., 1850, 73, 322.
- 23 - SCHOPFER (W.H.) - Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 1113.
- 24 - SCHOPFER (W.H.), POSTERNAK (Th.) et Mlle BOSS (M.L.) - Revue Int.
de Vitaminologie, 1948, 20, 121.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - Historique	3
CHAPITRE II - Méthodes de dosage et de caractérisation des inositols employées au cours de ce travail	6
CHAPITRE III - Teneur en inositols et glucides de diverses urines humaines et de différentes espèces animales.....	23
CHAPITRE IV - Essais d'isolement des inositols urinaires	26
CHAPITRE V - Nouvelle tentative de fractionnement avec l'urine humaine	45
CHAPITRE VI - Séparation et caractérisation, par chromato- graphie, du mésoinositol et du scyllitol dans des urines de mammifères	49
CONCLUSIONS GENERALES	55
BIBLIOGRAPHIE	57
